INSTRUMENTIERUNG VON FERMENTATIONSANLAGEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

ANTON HASENBÖHLER

aus Basel

1978

INSTRUMENTIERUNG VON FERMENTATIONSANLAGEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

ANTON HASENBÖHLER

aus Basel

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Januar 1978

Dekan	:	Professor Dr. K.-P. Hadeler
1. Berichterstatter	:	Professor Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter	:	Professor Dr. D. Mecke

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die wichtigen Anregungen und die stete Förderung danke ich Herrn Prof. Dr. H. Zähner.

Herrn D. Neubauer möchte ich für sein zusätzliches Engagement, das mich von vielen Arbeiten bei den Fermentationen befreite, danken.

Mein besonderer Dank gilt den Herren G. Schneck und A. Müller in unserer mechanischen Werkstatt; sie sind am Zustandekommen der in dieser Arbeit beschriebenen Anlagen und Systeme maßgeblich beteiligt.

Weiterhin möchte ich den in der Arbeit zitierten Firmen und ihren Mitarbeitern für die großzügige Überlassung vieler Abbildungen und Unterlagen sowie für fruchtbare Anregungen danken.

Allen Mitarbeitern danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0076

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	PROZESSFÜHRUNG	6
1.	Regelstrecke	10
2.	Regler	14
2.1.	Stetige Regler	15
2.1.1.	P-Regler	15
2.1.2.	PD-Regler	17
2.1.3.	I-Regler	19
2.1.4.	PI-Regler	20
2.1.5.	PID-Regler	21
2.2.	Nichtstetige Regler	22
2.2.1.	Zweipunkt-Regler	23
2.2.2.	Dreipunkt-Regler	25
III.	FERMENTER-DESIGN	29
1.	Membrananschlußtechnik	32
2.	Einbau von Sensoren	37
3.	Wechselsonden	38
4.	in-situ-Reinigung von Sensoren	41
5.	Probenahme-System	42
6.	Stellglieder	44
7.	Instrumentierung	49
7.1.	Impuls-Geber und -Registrierung	50
8.	Überwachung physikalischer Parameter	52
8.1.	Temperatur	52
8.2.	Durchfluß-Rate	54
8.2.1.	Gase	54
8.2.2.	Flüssigkeiten	57
8.3.	Schaum	58
8.4.	Flüssigkeitsvolumen	61

Seite

9. Überwachung chemischer Parameter 66
9.1. Elektrochemische Sensoren 66
9.1.1. Potentiometrische Elektroden 66
9.1.2. Amperometrische Elektroden 71
9.1.3. Enzym-Elektroden 72
9.2. pH 74
9.2.1. pH-Elektrode 74
9.2.2. pH-Verstärker 85
9.2.3. pH-Regler 92
9.3. O_2, CO_2 und flüchtige Substanzen 96
9.3.1. Sauerstoff-Elektroden 98
9.3.1.1. Sauerstoff-Verstärker 110
9.3.1.2. Sauerstoff-Regler 112
9.3.2. CO_2-Elektrode 113
9.3.3. Paramagnetische O_2-Messung 115
9.3.4. Infrarot-CO_2-Messung 120
9.3.5. GC-Analysensystem 127
9.3.6. Massenspektrometer 129

IV. BIOTECHNOLOGISCHE ASPEKTE 136
1. Sterilisation und Sterilhaltung 136
1.1. Abtötung von Mikroorganismen 139
1.2. Sterilisation der Belüftungsluft 146
2. Rührung und Belüftung 148
2.1. Sauerstoff-Eintrag und -Bedarf 149
2.1.1. Löslichkeit von Sauerstoff 149
2.1.2. Sauerstoff-Bedarf 151
2.2. Widerstände beim Sauerstoff-Eintrag 151
2.2.1. Absorptionsgleichung 151
2.2.2. Methoden zur K_La-Messung 152
2.2.3. Individuelle Widerstände und K_La 153
2.3. Widerstände auf der Bedarfsseite 156
2.3.1. Flüssigkeitsfilm um Zellen oder Zellaggregate 156
2.3.2. Sauerstoffübergang in Mycel-Pellets 157

Seite

2.4. Rühren 159
2.5. Methoden zur Regelung des Sauerstoffgleichgewichts 165
3. Regulation 167
3.1. pH-Feeding 168
3.2. pO_2-Feeding 170
3.3. Kontinuierliche Verfahren 172
3.3.1. Fed-Batch 173
3.3.2. Repeated-Fed-Batch 174
3.3.3. Chemostat 174
4. Gateway-Sensoren 177

V. DISKUSSION 180

VI. ZUSAMMENFASSUNG 192

VII. LITERATUR 193

Allgemeine Vorbemerkungen

Da die vorliegende Arbeit vom Thema her aus dem hier am Institut üblichen Rahmen herausfällt, werden einleitend einige allgemeine Prinzipien über Regel- und Meßtechnik ausgeführt, die als Basis für das Verständnis der folgenden speziellen Kapitel anzusehen sind.

I. EINLEITUNG

Angewandte Mikrobiologie ist, wie alle biologischen Disziplinen, keine exakte Wissenschaft. Dazu fehlt ihr die feste Grundlage, wie sie Theoreme und Prinzipien der Mathematik und der Physik verschaffen. Ein Empirismus, der sich überall breit macht und dominiert, durchdringt Theorie, Verfahren und Gerätschaft und verhindert daher eine vernünftige Entwicklung. Diese Lage ist zum Teil in der Tatsache begründet, daß die angewandte Mikrobiologie die verschiedensten Fachgebiete wie Physiologie, Biochemie, Genetik, Chemie und Verfahrenstechnik, um nur einige zu nennen, umfaßt und sich deren bedient. Alle diese Bereiche haben nur wenige oder keine gemeinsamen Berührungspunkte, obwohl sie durch die Zell-Aktivität in einem gewissen Sinne miteinander verbunden sind. Durch diese interdisziplinäre Stellung entstehen unvermeidlich Schwierigkeiten: der Biologe sieht die Probleme als solche der Biologie, ebenso perspektivisch sieht sie der Biochemiker, Chemiker und Ingenieur. Dadurch werden die Probleme, Projekte, Prozesse und Verfahrensentwicklungen aus dieser Sicht beschrieben und als mehr oder weniger empirische Daten in der Literatur gesammelt. Dieser enormen Häufung an Informationen und Kenntnissen fehlt der innere Zusammenhang, die Integration, die notwendig ist, um auf sie in einer positiven Weise zu bauen. Man braucht nur an die Schwierigkeiten des scale-up oder an die unregelmäßige Reproduzierbarkeit von Ausbeute und Batch-Ansätzen zu denken, um zu sehen, wie frustrierend die gegenwärtige Situation in der angewandten Mikrobiologie sein kann.

Bis in die jüngste Vergangenheit war der Betrieb von Fermentationen eine Kunst, die von einzelnen Individuen durch langjährige Erfahrung erworben wurde. Jede Firma hatte ihre Fermentationsspezialisten mit diesem "feeling". Allmählich hat sich die Überzeugung durchgesetzt - wahrscheinlich aufgrund zwingender wirtschaftlicher Überlegungen - daß der Betrieb und die Optimierung von Fermentationsprozessen zuverlässiger und mit kleinerem Risiko verbunden sind, wenn man diese auf meßbaren anstelle von nichtmeßbaren Parametern

aufbaut.
Während der letzten fünfzehn Jahre wurden in der Entwicklung von Sensoren enorme Fortschritte gemacht, die den Biotechnologen in die Lage versetzen, Art und Weise zu erfassen, in welcher die verschiedenen Umweltfaktoren die Fermentation beeinflussen. Mehr und mehr wurde man sich bewußt, in welchem Maße die Systembedingungen die Produktausbeute durch die Mechanismen der Repression, Induktion und Inhibition bestimmen. In der Vergangenheit wurden diese Regulationsmechanismen durch Mutation und Stammselektion in die Fermentationsorganismen hinein- oder aus ihnen herausgezüchtet. Die Fermentationsoptimierung kann nur in vereinzelten Fällen die Stammbearbeitung ersetzen, aber immer bringt eine Optimierung der Betriebsparameter auch eine Ausbeutesteigerung. Dazu sind drei Schritte in der aufgezeichneten Reihenfolge notwendig (57):

1. Fermentationsforschung in hochinstrumentierten Fermentationsanlagen;
2. Korrelation der beobachteten Umwelteinflüsse mit bekannten Zell-Regulationsmechanismen;
3. Reproduktion der gewünschten Systembedingungen durch eine kontinuierliche Computerüberwachung, Analyse und Rückkoppelungsregelung (feed-back).

Verschiedentlich wurde Schritt 3 unternommen, ohne vorher die beiden ersten Schritte absolviert zu haben. Dies ist eine Arbeit in einer Art "black box". Der Regelverlauf wurde dadurch ermittelt, daß das System willkürlich gestört und das daraus resultierende Verhalten registriert wurde. Aus diesen Beobachtungen wurde ein Modell konstruiert und eine Rückkoppelungsschleife für die Computerregelung entworfen. Dieses Verfahren war ein wichtiger Schritt in der Entwicklung einfach deshalb, weil adäquate Überwachungssysteme nicht existierten. Heute ist durch die Fortschritte in der Entwicklung von Sensoren ein eher wissenschaftlicher Weg zur Computerregelung möglich. Die Datenerfassung setzt zunächst die Ermittlung der Meßwerte durch geeignete Sensoren

voraus. Ein direkter Weg zur späteren Computerregelung von Fermentationsprozessen sind daher Versuche, bei welchen alle meßbaren Umweltfaktoren ermittelt und überwacht werden. Bereits bei dieser notwendigen Voraussetzung treten bei Fermentationen einige besondere Probleme auf.
Die zu messenden Parameter können nach verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden:

1. der Wirkungsebene: physikalische, chemische, biologische und molekularbiologische Systeme;
2. der Lokalisierung: extrazellulär, intrazellulär;
3. der Art der Messung: kontinuierlich, diskontinuierlich.

Einige der in Tab. 1 aufgeführten Parameter sind bereits meßbar und werden auch in Produktionsanlagen überwacht, andere sind nur mit Einschränkungen in Pilot-Anlagen zugänglich. Die kontinuierliche Messung einer weiteren Gruppe - dazu gehören insbesondere die intrazellulären Parameter - bereitet derzeit noch große Schwierigkeiten.

Physikalisch	Chemisch	
	in der Kulturlösung	im Zellaufschluß
Temperatur	pH-Wert	DNS-Konz.
Druck	Redox-Potential	RNS-Konz.
Leistungsaufn.	O_2-Gehalt	NAD, NADH
Drehzahl	CO_2-Gehalt	ATP, ADP, AMP
Luftdurchsatz	Kohlenstoff-Quelle	Protein-Konz.
Schaumhöhe	Stickstoff-Quelle	Enzym-Aktivitäten
Mediumzugabe	Diverse Ionen-Konz.	
Viskosität	Precursor-Level	
Flüssigkeitsvol.		
Zelldichte		
Kühlwasserrate		
- Temperatur		

Tab. 1: Liste der zu messenden Parameter eines Fermentationsprozesses (89).

Wahrscheinlich der wichtigste einzelne Fortschritt auf dem Gebiet der Fermentationsüberwachung war die Entwicklung der in-situ sterilisierbaren Elektrode für die Messung des gelösten Sauerstoffes. Doch gerade bei diesen Messungen wurde offensichtlich, wieviele Faktoren ein Meßsignal beeinflussen oder gar stören können. Selbst bei einfachen Regelkreisen, wie z.B. dem des pH-Wertes, die seit längerer Zeit zur Grundausrüstung eines Fermenters gehören, können Schwierigkeiten auftreten, sei es, daß die Meßgeber falsche Signale abgeben, oder, daß der übrige Teil des Regelkreises der Regelungsaufgabe nicht angepaßt ist. Der Mikrobiologe, der sich mit Fermentation beschäftigt, sollte sich daher ein Minimum an Grundkenntnissen über Meß- und Regeltechnik aneignen. Ist er dazu nicht bereit, sollte er von Messungen und Regelungen ganz absehen, denn die Menge der empirischen und zufälligen Daten in der Fachliteratur ist bereits unübersehbar. Erschwerend wirkt sich zusätzlich die Tatsache aus, daß Fermenter und deren Instrumentierung von Leuten entwickelt werden, die mit der Mikrobiologie des Systems nicht sehr vertraut sind.

Das Ziel dieser Arbeit läßt sich in mehrere Punkte aufteilen:

- Den am Anfang dieser Arbeit stehenden allgemeinen Grundlagen über Meß- und Regeltechnik schließen sich die speziellen Regelkreise an, wie sie in der Fermentationstechnologie auftreten. Zur Illustration und Erläuterung werden die vier vor zwei Jahren am Institut erstellten Fermentereinheiten herangezogen und anderen Varianten gegenübergestellt.

- Wegen der wichtigen Rolle, die der Sauerstoff im aeroben Stoffwechsel spielt, behandelt diese Arbeit sowohl dessen Messung und Regelung wie dessen Transport von der Gasblase in die Zelle ausführlich.

- Der Abschnitt über Regulation (IV.3.) soll, vom apparativen Aufwand her gesehen, einfache Möglichkeiten zur Regulation von Biosyntheseprozessen zeigen.

- Da verschiedene der beschriebenen Kontrollsysteme als Gateway-Sensoren zu bezeichnen sind, d.h. den Weg für die Ermittlung nicht direkt meßbarer Variablen öffnen, folgt ein Kapitel über die Ermittlung durch Kombination meßbarer Größen in Form von mathematischen Modellen.

II. PROZESSFÜHRUNG

Die Elemente für die Automatisierung sind Steuerungs- und Regeleinrichtungen. Ein Steuerungsvorgang unterscheidet sich prinzipiell von einem Regelungsvorgang in seinem Wirkungsablauf.
In der Systemtechnik werden zwei Forderungen an einen zu steuernden bzw. zu regelnden Prozeß gestellt:

1. Der Prozeß muß beobachtbar sein, d.h. der jeweilige Zustand des Prozesses muß sich aus Meßgrößen und Meldungen erfassen lassen, um eine genaue Kenntnis vom aktuellen Prozeßablauf zu erhalten.

2. Der Prozeß muß steuerbar sein, d.h. der Prozeßablauf muß durch die maßgeblichen Stellgrößen ein vorgegebenes Ziel erreichen können.

Das Kennzeichen einer Steuerung ist, daß die Signalübertragung nur in einer Richtung vor sich geht, und daß es sich dabei um einen offenen Wirkungsablauf handelt. Sie vermag nur eine steuernde mit einer gesteuerten Größe in einen festen Zusammenhang zu bringen. Alle anderen Einflüsse (Störgrößen) auf die gesteuerte Größe können durch die Steuereinrichtung nicht vermieden werden. Steuerungen, auch solche, die nach einem vorprogrammierten Zeitplan ablaufen (102), sollten in der Fermentation der Vergangenheit angehören. Selbst noch so ausgeklügelte Steuerungsabläufe (z.B. zeitabhängiges Feeding) werden den Bedürfnissen einer Organismenpopulation in keinem Fall gerecht, weil nicht die gesteuerte Größe Ursache des Steuervorgangs ist (88).
Die Aufgabe der Regelung besteht darin, eine bestimmte Größe innerhalb einer Anlage entweder konstant zu halten oder nach einem vorgeschriebenen Programm zu ändern, unabhängig von irgendwelchen Störgrößen. Dazu ist es notwendig, daß die zu regelnde Größe laufend gemessen und ihr Wert mit einem vorgegebenen Sollwert verglichen wird. Die Regeleinrichtung muß dann so beschaffen sein, daß sie auf eine Abweichung vom Sollwert reagiert. Dabei verstellt sie ein ge-

eignetes Stellglied in der Weise, daß die aufgetretene Abweichung der zu regelnden Größe von ihrem Sollwert beseitigt wird. Treten in einem solchen System Störgrößen auf, so bewirken sie eine Regelabweichung, die einen Regelvorgang auslöst. Die Wirkung der Störgrößen selbst ist somit Ursache des Regelvorganges. Ein wesentlicher Unterschied zwischen einer Steuerung und einer Regelung besteht ferner darin, daß bei einer Steuerung das Problem der Stabilität oder Instabilität des Systems nicht vorhanden ist. Bei dem geschlossenen Wirkungsablauf einer Regelung dagegen ist es notwendig, das Übertragungsverhalten der vorhandenen Systemteile aufeinander abzustimmen, um einen stabilen Regelverlauf zu erzielen.

Man unterteilt den Regelkreis in folgende Elemente: in die Regelstrecke und den Regler oder die Regeleinrichtung. Die Regelstrecke ist jener Abschnitt, in dem die zu regelnde Größe, die Regelgröße x, erfaßt, geregelt und auch gestört wird. Sie ist eigentlich der zentrale Teil jedes Regelkreises. Nach der Art und Weise, wie sie auf Störungen und Stellgrößenänderungen reagiert, wird die Regeleinrichtung konzipiert und eingestellt. Das Signal, durch das das Stellglied betätigt werden kann, bezeichnet man als Stellgröße y. Die durch die Störgröße z verursachte Regelabweichung x_w ist die Abweichung der Regelgröße x von einer vorgegebenen Führungsgröße w. Die Führungsgröße bestimmt den Wert, auf den die Regelgröße geführt werden soll (Sollwert). Als Istwert bezeichnet man den momentanen Wert der Regelgröße x. Eine Festwertregelung liegt vor, wenn die Führungsgröße w eine Konstante ist. Bei einer Folgeregelung ist die Führungsgröße w entweder eine Funktion der Zeit oder eine Funktion irgend einer anderen Größe.

Um die Gesetzmäßigkeiten eines Regelverlaufs besser zu erkennen, kann man sich von der technischen Ausführung der in einem Regelkreis befindlichen Geräte lösen und sie einzeln als reine Signalüberträger mit einer Eingangs- und einer Ausgangsgröße betrachten. So kann man die Regelstrecke als einen Block mit der Stellgröße y als Eingangsgröße und der

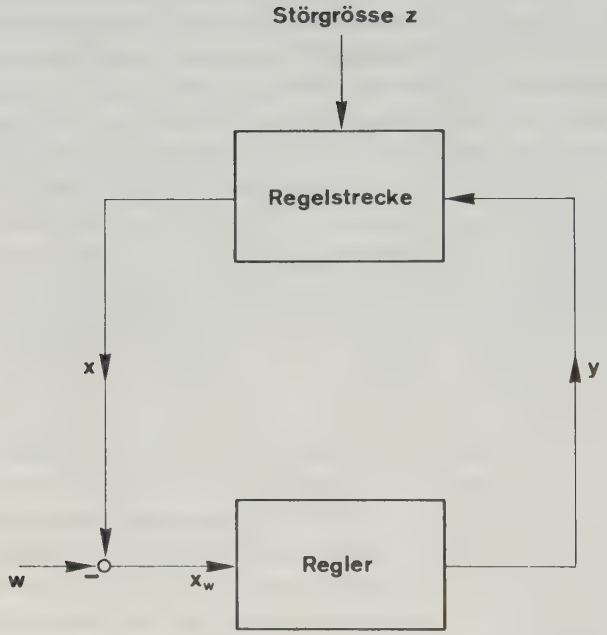


Abb. 1: Blockschaltbild des Regelkreises

Regelgröße x als Ausgangsgröße zeichnen. Analog läßt sich der Regler als Block mit den Eingangsgrößen x und w und der Ausgangsgröße y wiedergeben.
Bei dieser Darstellungsweise darf nicht übersehen werden, daß sowohl Regelstrecke wie Regeleinrichtung aus einzelnen Signalüberträgern zusammengesetzt sind. Durch den Block soll gekennzeichnet sein, daß zwischen der Eingangsgröße und der Ausgangsgröße ein funktioneller Zusammenhang besteht. Die Übertragungselemente, die Blöcke des Regelkreises, haben im allgemeinen ein Zeitverhalten; die Eingangs- und die Ausgangsgrößen sind Funktionen der Zeit: $x_e = x_e(t)$ bzw. $x_a = x_a(t)$. Der Zusammenhang zwischen $x_a(t)$ und $x_e(t)$ kann

durch lineare Differentialgleichungen mit konstanten Koeffizienten beschrieben werden. In den meisten Fällen der Praxis ist ein solcher linearer Zusammenhang über den ganzen Bereich der Eingangsgröße nicht gegeben, und deshalb beschränkt man sich darauf, ein lineares Verhalten in einem entsprechend kleinen Bereich anzunehmen. Nichtlinearitäten werden im Blockschaltbild durch einen Kreis mit eingezeichneter statischer Kennlinie dargestellt.

Um die in einem Regelkreis vorkommenden Glieder hinsichtlich ihres zeitlichen Übertragungsverhaltens miteinander vergleichen zu können, ist es zweckmäßig, immer die gleiche Eingangsfunktion zu verwenden und den Verlauf der Ausgangsgröße als kennzeichnend für das betreffende Glied anzusehen. Am gebräuchlichsten ist als Eingangsfunktion die Sprungfunktion. Die Eingangsgröße $x_e(t)$ ändert sich zur Zeit $t = 0$ um den Betrag 1. Den Verlauf, den die Ausgangsgröße nach einer sprungartigen Eingangsänderung vom Zeitpunkt $t = 0$ an hat, bezeichnet man als Übertragungsfunktion des Signalüberträgers. Sie ist die Lösung der das Zeitverhalten beschreibenden Differentialgleichung, wenn zur Zeit $t = 0$ die Eingangsgröße $x_e(t) = 0$ und für $t > 0$ die Größe $x_e(t) = 1$ ist. Es ist üblich, bei Darstellung der einzelnen Signalüberträger im Blockschaltbild die Übergangsfunktion in die jeweiligen Blöcke einzuzeichnen.

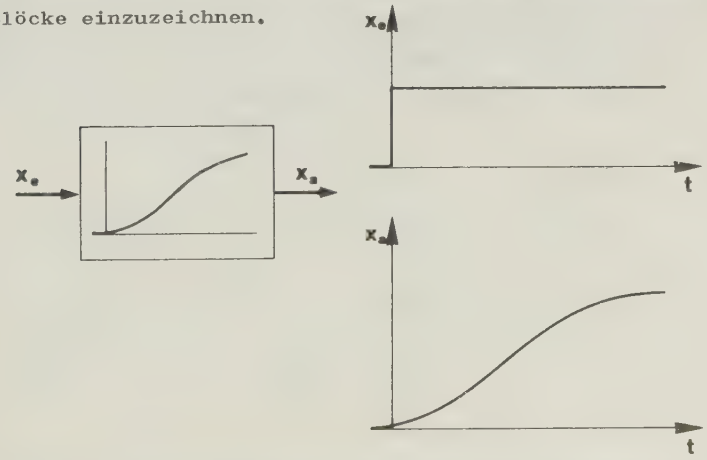


Abb. 2: Übergangsfunktion eines Signalüberträgers

1. Regelstrecke

Bei Annahme linearer Überträger kann man also das Zeitverhalten einer Regelstrecke durch die allgemeine lineare Differentialgleichung

$$s_n x^{(n)} + \cdots + s_3 x''' + s_2 x'' + s_1 x' + s_o x = y$$

beschreiben. Die höchste Ableitung der beschreibenden Gleichung kennzeichnet die Ordnung der Regelstrecke. Man spricht von einer Regelstrecke n-ter Ordnung, wenn ihr Zeitverhalten exakt oder wenigstens mit sehr guter Annäherung durch eine Differentialgleichung n-ter Ordnung dargestellt werden kann. Der einfachste Fall ist eine Regelstrecke der Ordnung 0 mit der Gleichung:

$$s_o x = y$$

Die Übergangsfunktion zeigt sich ebenfalls als Sprungfunktion.

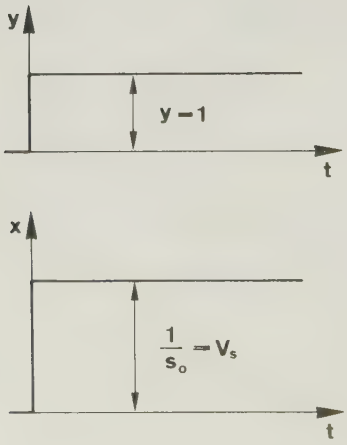


Abb. 3: Übergangsfunktion einer P-Strecke

Einschränkend muß erwähnt werden, daß solche Regelstrecken mit einem streng proportionalen Verhalten in Wirklichkeit so gut wie nie vorkommen. Die meisten Regelstrecken sind mit Verzögerungen behaftet, d.h. die Ausgangsgröße folgt nicht unmittelbar einer sprungartigen Eingangsgröße, sondern mit einer zeitlichen Verzögerung. Die einfachste verzögerte Regelstrecke ist die Regelstrecke 1. Ordnung mit der Gleichung:

$$s_1 x' + s_o x = y$$

bzw.

$$T_s x' + x = V_s y \text{ mit } T_s = \frac{s_1}{s_o} \text{ und } V_s = \frac{1}{s_o}$$

Die Lösung der Gleichung bei einer Sprungfunktion (Sprung zur Zeit t = 0 vom Betrag 1) ist bekanntlich eine e-Funktion der Form:

$$x = V_s \left(1 - e^{-\frac{t}{T_s}}\right)$$

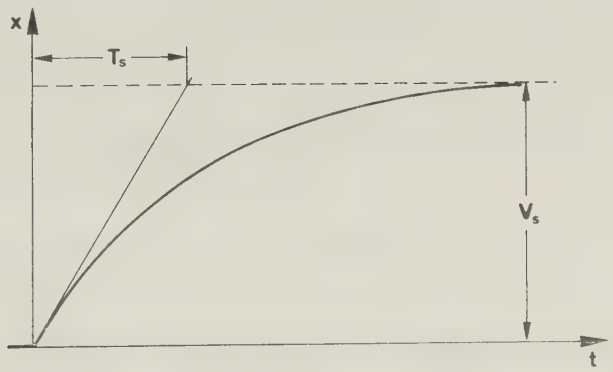


Abb. 4: Übergangsfunktion einer Regelstrecke 1. Ordnung

Kenngrößen für eine Regelstrecke 1. Ordnung sind die Zeitkonstante T_s und der Verstärkungsfaktor V_s.

Eine Regelstrecke 2. Ordnung wird durch eine Differentialgleichung der Form

$$s_2x'' + s_1x' + s_ox = y$$

beschrieben. Das ist die bekannte Schwingungsgleichung, die beispielsweise in der Mechanik das Verhalten eines Feder-Masse-Systems mit Dämpfung beschreibt. Die Übergangsfunktion eines solchen Systems zeigt ein oszillatorisches Verhalten. Besteht die Regelstrecke jedoch aus zwei hintereinandergeschalteten Gliedern 1. Ordnung, so wird die Übergangsfunktion einen Verlauf zeigen, wie ihn die Abb. 5 darstellt. Einen ähnlichen Verlauf haben die Übergangsfunktionen von Regelstrecken höherer Ordnung. Bei einer sprungartigen Eingangsänderung wird die Ausgangsgröße mit einer waagrechten Tangente aus dem Beharrungszustand herauslaufen. Die Kurve hat einen Wendepunkt und nähert sich asymptotisch einem neuen Beharrungszustand. Eine derartige Übergangsfunktion findet man z.B. bei Temperatur-Regelstrecken.

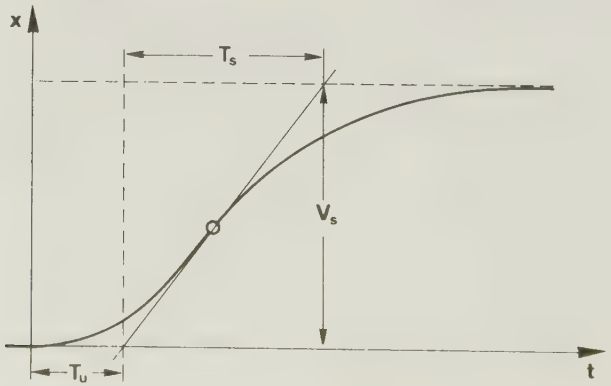


Abb. 5: Kenngrößen V_s, T_s und T_u einer Regelstrecke höherer Ordnung mit Ausgleich.

Um den Verlauf der Übergangsfunktion und damit das Zeitverhalten derartiger Übertragungssysteme zu kennzeichnen, kann man durch eine Wendetangente an die Übergangsfunktion die Kenngrößen, die Verzugszeit T_u, die Zeitkonstante T_s und den Verstärkungsfaktor $V_s = \triangle x\% / \triangle y\%$ feststellen. Eine Regelstrecke ist um so schwerer zu regeln, je größer das Verhältnis T_u/T_s ist. Die Regelstreckenparameter hängen von dem Aufbau der zu regelnden Anlage ab.
Eine besondere Art von Regelstrecken sind solche, die eine Totzeit enthalten. Wird die Eingangsgröße sprungartig geändert, so erfolgt eine Änderung der Ausgangsgröße erst nach Ablauf einer bestimmten Totzeit T_t.

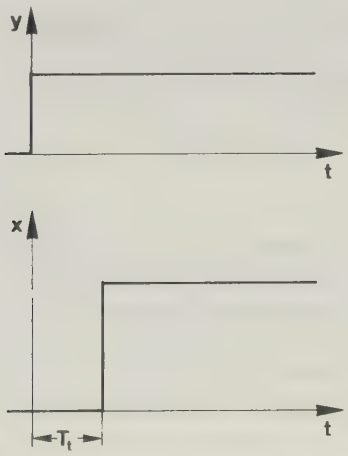


Abb. 6: Übergangsfunktion eines Totzeitgliedes

Häufig sind die Fälle, bei denen die Übergangsfunktion eine Totzeit und eine Verzögerungszeit enthält. Das Übergangsverhalten kann ebenfalls einem System höherer Ordnung entsprechen.

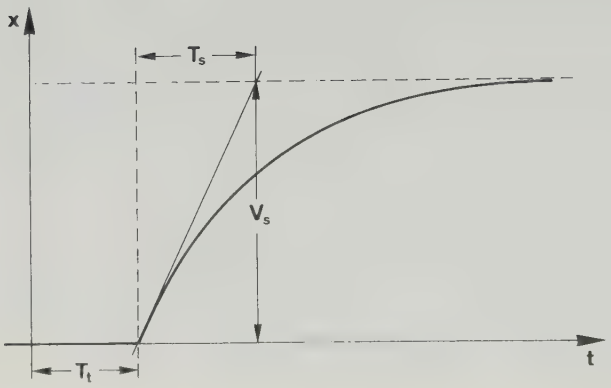


Abb. 7: Übergangsfunktion einer Regelstrecke mit Totzeit

2. Regler

In der Praxis, insbesondere bei Regelanlagen in der Verfahrenstechnik, ist der Aufbau der Regelstrecke und deren zeitliches Verhalten in den meisten Fällen vorgegeben. Dadurch sind bei der Regelanlage nur der Regler-Typ und dessen Einstellparameter frei wählbar, d.h. der Regler muß der Regelstrecke angeglichen werden. Je nach Kombination von Strecke und Regler kann diese zu einem mehr oder weniger gut gedämpften oder instabilen Verhalten führen.
Es wurde bereits erwähnt, daß ein Regler aus mehreren Elementen besteht. Eine besondere Bedeutung bei der gerätetechnischen Ausführung hat die Gegenkopplung als sogenannte Rückführung des Reglers. Man verwendet Rückführungen, weil man damit sehr leicht die Art des Reglers, d.h. sein Verhalten, realisieren kann.
Bei der Gegenkopplung wird der Ausgang des Reglers über einen Überträger derart zurückgeführt, daß die rückgeführte Größe von der Eingangsgröße subtrahiert wird.

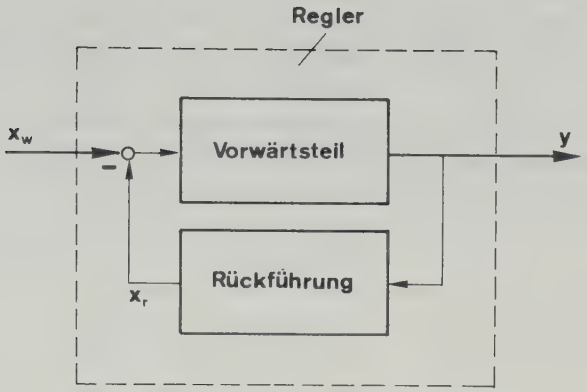


Abb. 8: Vorwärtsteil und Rückführung eines Reglers

2.1. Stetige Regler

Stetige oder kontinuierliche Regler wirken auf proportionale Stellglieder. Entsprechend haben stetige Regler eine in der Amplitude stetig veränderliche Stellgröße, meist einen Gleichstrom von 0 ... 20 mA. Zur Darstellung der heute gebräuchlichen Regler soll deren Übergangsfunktion verwendet werden.

2.1.1. P-Regler

Beim Proportionalregler ist die Ausgangsgröße proportional der Eingangsgröße, also:

$$y = V_R \cdot x_w$$

Hat der Regler Verzögerungen, so lautet seine allgemeine

Gleichung:

$$T_m y^{(m)} + \ldots + T_2 y'' + T_1 y' + y = V_R \cdot x_w$$

V_R ist der Verstärkungsfaktor des Reglers, der bei technischen Ausführungen in weiten Grenzen einstellbar ist. Die Übergangsfunktion ist eine Sprungfunktion. Aus der Definition des P-Reglers ergibt sich, daß der Regler nur dann eine Veränderung des Stellgliedes vornimmt, wenn eine Regelabweichung vorliegt, oder anders ausgedrückt, er benötigt für eine Veränderung des Stellgliedes eine Regelabweichung. Eine Störgröße, die in der Regelstrecke eine Regelabweichung hervorruft, kann demnach durch einen P-Regler in ihrer Wirksamkeit nur eingeschränkt werden, er kann eine Regelabweichung jedoch nicht vollständig beseitigen. Es bleibt eine anhaltende Regelabweichung, die umso kleiner wird, je größer V_R eingestellt ist. V_R kann jedoch nicht beliebig groß gewählt werden, ohne unzulässig langandauernde Schwingungen der Regelgröße hervorzurufen oder gar die Stabilität des Regelkreises zu gefährden. In der Praxis ist man dazu über-

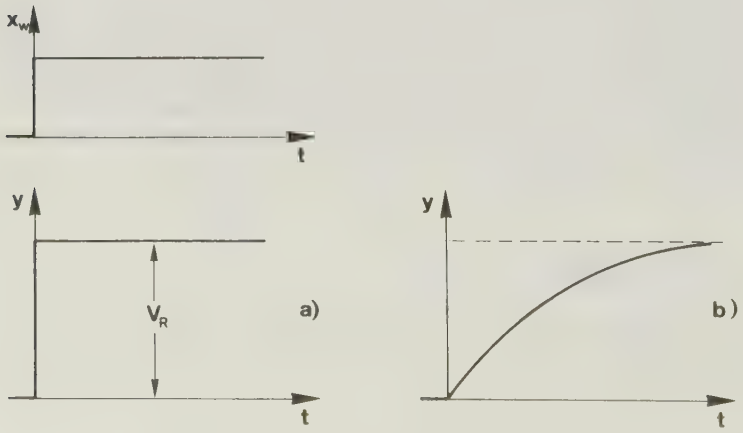


Abb. 9: Übergangsfunktion eines P-Reglers
a) Idealer P-Regler b) Regler mit Verzögerung

gegangen, an Stelle des Verstärkungsfaktors V_R als einstellbarem Parameter den Begriff des Proportionalbereichs x_p einzuführen (kurz P-Bereich). Darunter versteht man diejenige Größe der Regelabweichung, die notwendig ist, um das Stellglied von einer Endlage in die andere zu versetzen, die Stellgröße y also über den ganzen Bereich y_h zu ändern. In einer Formel ausgedrückt, ergibt sich:

$$y_h = V_R \cdot x_p \qquad \text{oder} \qquad x_p = \frac{y_h}{V_R}$$

Der P-Bereich kann also in der Dimension der Regelgröße angegeben werden. Für den universellen Einsatz der Regler ist es zweckmäßig, den P-Bereich in Prozent zu eichen:

$$x_p\% = \frac{1}{V_R} \; \frac{\text{Stellbereich } y_h}{\text{Meßbereich}} \; 100\ \%$$

2.1.2. PD-Regler

Um die Wirksamkeit eines P-Reglers zu erhöhen, sind Regler entwickelt worden, bei denen die Ausgangsgröße y noch zusätzlich durch die Änderungsgeschwindigkeit von x_w bestimmt wird. Der Regler spricht also bereits auf Differentialquotienten von x_w an (D-Anteil).
Die lineare Differentialgleichung für einen idealen PD-Regler lautet:

$$y = V_R \, (x_w + T_v \, x'_w)$$

Der Einstellparameter T_v des Reglers, der den D-Anteil bestimmt, wird Vorhaltzeit genannt. Der Differentialquotient der Sprungfunktion x_w ergibt eine Nadelfunktion. Die Ausgangsgröße y springt zur Zeit t = 0 ins Unendliche und kehrt auf den P-Anteil entsprechend dem Wert V_R zurück. Gerätetechnisch läßt sich eine echte Differentiation nicht verwirklichen. Die Regler haben mindestens eine Verzögerung

1. Ordnung gemäß der Gleichung:

$$T_1 y' + y = V_R \left(x_w + T_v x'_w\right)$$

Durch diese Verzögerung verschwindet in der Übergangsfunktion die Unendlichkeitsstelle bei t = 0 und es ergibt sich ein Verlauf, wie er in Abb. 10b dargestellt ist; y springt bei t = 0 um einen Betrag, der von demjenigen des Eingangssprungs der beiden Parameter V_R, T_v des Reglers und seiner Verzögerungszeit abhängt. Für $t > 0$ klingt die Ausgangsgröße mit der Zeitkonstanten T_1 auf den durch V_R bestimmten Proportionalanteil des Reglers ab.

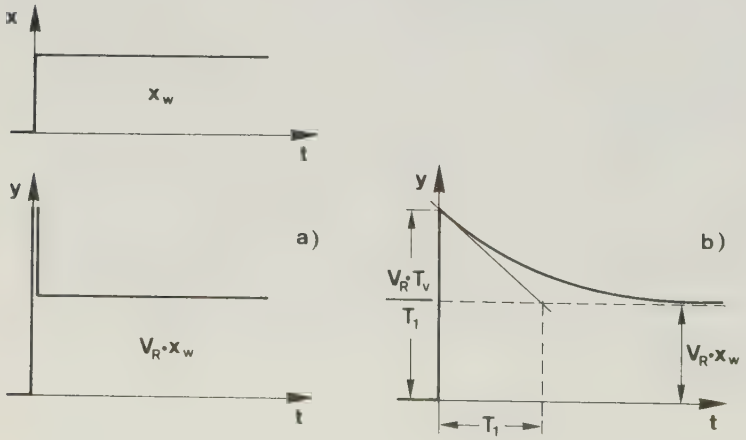


Abb. 10: Übergangsfunktion eines PD-Reglers
a) Idealer Regler b) Regler mit Verzögerung

2.1.3. I-Regler

Eine weitere Reglerart stellt der I-Regler dar. Seine Bezeichnung rührt von der Tatsache her, daß die Stellgröße proportional dem zeitlichen Integral über die Regelabweichung ist, sich also entsprechend der Gleichung:

$$y = c_R \int (x_w \, dt)$$

bzw.

$$T_m y^{(m)} + \ldots + T_1 y' + y = c_R \int (x_w \, dt)$$

verhält.

Eine Verstellung des Stellgliedes wird also solange erfolgen, wie eine Regelabweichung vorhanden ist. Der Regler ist somit in der Lage, den Einfluß der Störgröße auf die zu regelnde Größe zu beseitigen. Nach Ablauf des Regelvorganges wird $x_w = 0$. Der Einstellparameter c_R des Reglers, der eine Anpassung an das Zeitverhalten der Regelstrecke ermöglicht, ist die auf die Regelabweichung bezogene Änderungsgeschwindigkeit von y.

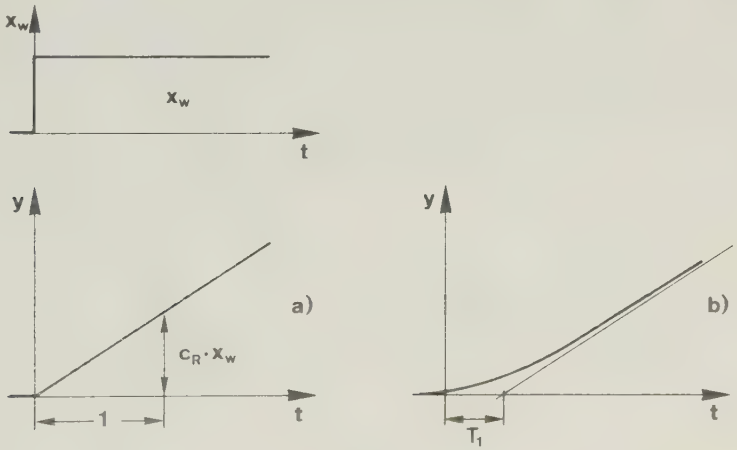


Abb. 11: Übergangsfunktion eines I-Reglers
a) Idealer Regler b) Regler mit Verzögerung

2.1.4. PI-Regler

Bei einem PI-Regler hat man das Zeitverhalten des P- und I-Reglers in einem Gerät zusammengefaßt. Die Verstellung des Stellgliedes erfolgt also nach dem Betrag der Regelabweichung (P-Anteil) und nach dem zeitlichen Integral (I-Anteil). Die das Zeitverhalten beschreibende Gleichung lautet:

$$T_m y^{(m)} + \ldots + T_1 y' + y = V_R\, x_w + c_R \int x_w\, dt = V_R \left(x_w + \frac{1}{T_n} \int x_w\, dt \right)$$

Die Zeitkonstante $T_n = \frac{V_R}{c_R}$ wird Nachstellzeit genannt.

Durch Hinzunahme des I-Anteils wird der wesentliche Mangel der P-Regler, daß nämlich grundsätzlich eine bleibende Abweichung vom Sollwert vorhanden ist, beseitigt, da der PI-Regler solange eine Verstellung des Stellgliedes vornimmt, bis $x_w = 0$ ist. Die Anpassung eines PI-Reglers an das Zeitverhalten einer Strecke wird durch die dämpfende Wirkung des P-Anteils im Vergleich zu einem I-Regler mit gleichem c_R wesentlich erleichtert.

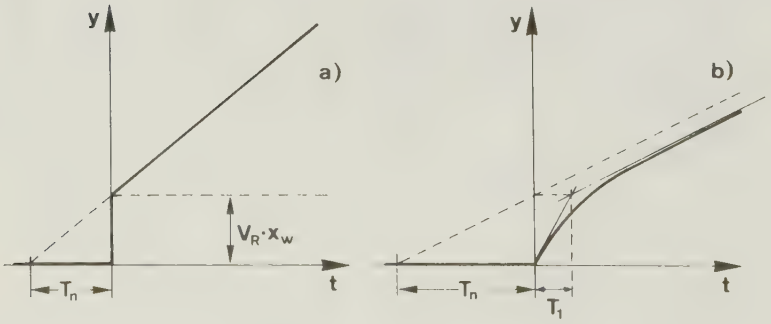


Abb. 12: Übergangsfunktion eines PI-Reglers
a) Idealer Regler b) Regler mit Verzögerung

2.1.5. PID-Regler

Schließlich kann man die drei grundsätzlichen Übertragungseigenschaften der Regler, nämlich proportionales, integrales und differentielles Verhalten, in einem Gerät zusammenfassen. Ein solcher Regler ist dann ein proportional-integraler Regler mit D-Anteil, der kurz PID-Regler bezeichnet wird.

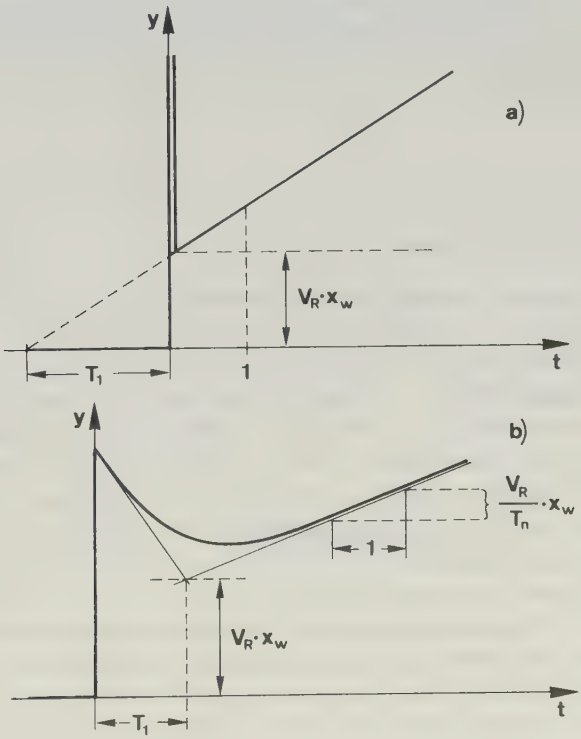


Abb. 13: Übergangsfunktion eines PID-Reglers
a) Idealer Regler b) Regler mit Verzögerung

Die das Zeitverhalten bestimmende Gleichung kann in folgender Form geschrieben werden:

$$T_m y^{(m)} + \ldots + T_1 y' + y = V_R \left(x_w + \frac{1}{T_n} \int x_w \, dt + T_v \, x_w \right)$$

Der Differentialanteil ergibt wieder die Nadelfunktion, die aus dem Unendlichen auf einen Betrag, der dem P-Anteil entspricht, zurückspringt. Für $t > 0$ addiert sich zu dem P-Anteil der I-Anteil des Reglers.
Bei technisch ausgeführten Reglern sind in den meisten Fällen als Parameter x_p in %, T_n und T_v in Minuten und Sekunden geeicht.

2.2. Nichtstetige Regler

In der Technik werden für die Regelung sehr oft Regler verwendet, deren Arbeitsweise durch bewußt eingebrachte Nichtlinearitäten gekennzeichnet sind. Die am häufigsten vorkommenden Regler dieser Art sind solche mit einer nichtstetigen Ausgangsgröße y in Form eines Zweipunkt- oder Dreipunktreglers. Sie werden vor allem in Regelkreisen eingesetzt, die Stellglieder mit nur zwei Schaltstellungen aufweisen und daher durch sich stetig ändernde Stellgrößen nicht betätigt werden können.
Solche Regeleinrichtungen dienen häufig als Überwachungsgeräte. Bei Überschreiten eines eingestellten Grenzwertes wird über ein Relais eine Signalanlage und/oder ein Stellglied betätigt.

2.2.1. Zweipunktregler

Die einfachste Regelfunktion ist die eines Zweipunktreglers. Der Name kommt daher, daß die Ausgangsgröße des Reglers nur zwei diskrete Werte annehmen kann. Es handelt sich also um eine reine Schaltfunktion. Der Schaltverstärker schaltet bei Istwert unter Sollwert, also bei negativer Eingangsspannung, das Ausgangsrelais ein und bei positiver Spannung wieder aus. Es ergibt sich ein Schaltspiel der Stellgröße zwischen zwei Punkten, nämlich "EIN" und "AUS", weswegen man solche Regler auch als Ein-Aus-Regler bezeichnet. Der Regelverlauf ist also eine Dauerschwingung der zu regelnden Größe.

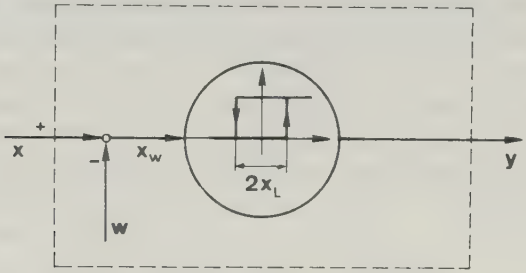
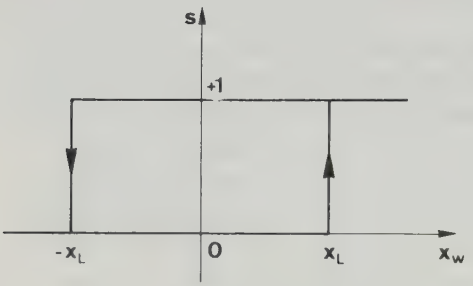


Abb. 14: Blockschaltbild eines Zweipunktreglers

Jedes Relais, jeder Kippverstärker hat zwei diskrete Werte der Eingangsgröße, bei denen die Ausgangsgröße von dem einen zum anderen Wert springt. Daraus folgt, daß es in der Praxis keine Schalter ohne Hysterese gibt. Benutzt man einen solchen Schalter als Zweipunktregler, so hat man die statische Kennlinie wie in Abb. 15 zu zeichnen. Die Hysteresebreite wird mit 2 x_L bezeichnet. Durch Verkleinerung der Hysterese gegen 0 würde die Schwankungsbreite zwar ebenfalls gegen 0, die Schaltfrequenz aber gegen Unendlich laufen.



$2\ x_L$	Hysterese
S	kennzeichnet den Schaltzustand
S = 1	Ausgangsrelais angezogen
S = 0	Ausgangsrelais abgefallen

Abb. 15: Statische Kennlinie des Zweipunktreglers

Das Regelverhalten eines Zweipunktreglers kann durch Verwendung einer Rückführung wesentlich beeinflußt werden. Das betrifft vor allem die Amplitude des Regelverlaufs. Ohne Rückführung ist bei einer Zweipunktregelung der Regelverlauf durch die Eigenschaften der Strecke bestimmt. Verwendet man eine zeitabhängige Rückführung, so bestimmt deren Zeitverhalten zusammen mit dem der Regelstrecke das Verhältnis der Einschaltzeit zur Ausschaltzeit des Reglers, und durch einstellbare Parameterwerte kann dieses Verhältnis verändert werden. Bei verzögert wirkender Rückführung erhält der Regler das Verhalten eines PD-Reglers. Durch V_r kann der P-Bereich eingestellt werden; T_r bestimmt die Schaltfrequenz des Reglers und ist damit ein Maß für den D-Anteil. Durch den P-Anteil wird der Mittelwert der Regelschwingungen im stationären Zustand eine bleibende Abweichung vom Sollwert haben.

Ist die Art der Rückführung verzögert-nachgebend, so wird der Regler die Eigenschaften eines PID-Reglers haben, was sich für diesen mit einem Schaltausgang versehenen Regler dadurch ausdrückt, daß die Impulshäufigkeit und das Verhältnis Einschalt- zu Ausschaltzeit einer PID-Funktion entspricht. (Impulsbreiten modulierter Schaltausgang). Die Regelgröße hat nach dem Einschwingvorgang keine bleibende Ab-

weichung, sondern läuft genau auf den Sollwert ein. Man kann somit die Parameterwerte wie bei einem Regler mit stetigem Ausgang in x_p, T_n und T_v eichen.

2.2.2. Dreipunktregler

Die Ausgangsgröße des Dreipunktreglers hat drei Schaltzustände. Außerhalb der Hysterese zieht bei negativer Abweichungsspannung das untere Relais an, bei positiver das obere.

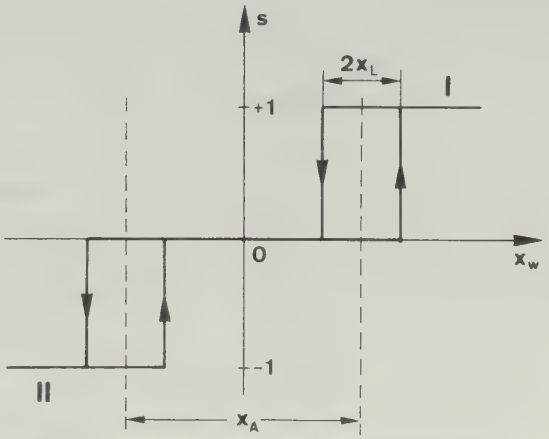


Abb. 16: Statische Kennlinie des Dreipunktreglers

$2\ x_L$	Hysterese
x_A	Abstand der Schaltpunktmitten
S	kennzeichnet den Schaltzustand
S=+1	Relais R_I angezogen
S=0	beide Relais abgefallen
S=-1	Relais R_{II} angezogen

Für die Betätigung von Stellorganen, wie Drosselklappen und Ventile, werden häufig elektrische Stellantriebe eingesetzt. Je nach dem Vorzeichen der Regelabweichung schaltet der Dreipunktregler den Motor des Stellantriebes in Links- oder Rechtslauf. Ist die Regelabweichung Null, so ist der Stellmotor ausgeschaltet.
Wird der Dreipunktregler mit einer Rückführung versehen, so ist der Schaltausgang x_a eine durch die zeitabhängige Rückführung modulierte Impulsfolge. Im Blockschaltbild kann man den Stellantrieb als ein Übergangssystem mit integraler Eigenschaft angeben, wobei als Ausgangsgröße der Stellweg y angenommen wird.

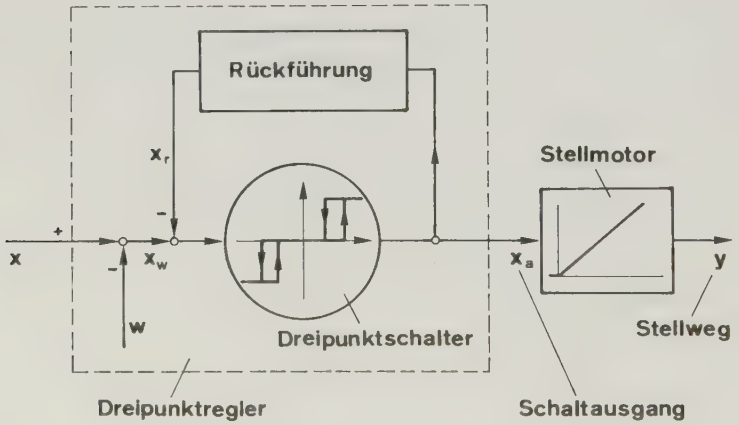


Abb. 17: Blockschaltbild eines Dreipunktreglers (Schrittregler)

Um der gesamten Regeleinrichtung einschließlich des Stellantriebes ein PI-Verhalten zu geben, muß die Impulsfolge des Schaltausganges durch die Rückführanordnung ein PD-Verhalten haben. Infolge der integralen Eigenschaften des Stellgliedes erhält man durch die schrittweise Änderung des Stellweges y, die durch die Schaltfolge bewirkt wird, einen Ver-

lauf, der einem PI-Regler sehr ähnlich ist. Aufgrund der schrittweisen Verstellung von y bezeichnet man derartige Regler auch als Schrittregler.
Bei Fermentationsprozessen basieren viele Regelungsvorgänge auf der Zugabe von Korrektur-Lösungen. Als Stellglieder kommen vor allem Absperrventile und Dosierpumpen zum Einsatz. Aufgrund ihrer binären Durchlaß-Charakteristik benötigen diese Stellglieder Regler mit entsprechenden Stellgrößen.

Regelstrecken von Mischprozessen - wie sie bei der Korrekturmittelzugabe auftreten - weisen aufgrund ihrer zeitabhängigen Durchmischung und Reaktion Verzögerungen auf. Zur Anpassung des Reglers an dieses Übergangsverhalten, wird dieser mit einer PID-Rückführung versehen. Bei diesem Regler-Typ (Impulsregler) resultiert der I-Anteil nicht aus den Eigenschaften des Stellgliedes, sondern ist intern verdrahtet.
Der Impulsregler als unstetiger Regler, also mit diskontinuierlich arbeitendem, gepulstem Ausgang, kann ebenfalls mit den Begriffen des stetigen Reglers beschrieben werden. Die mathematische Beschreibung - nicht aber die praktische Handhabung - des unstetigen Reglers ist anspruchsvoller als diejenige des stetigen Reglers. Eine exakte Korrekturmittelverbrauchs-Registrierung durch Integration der Impulszeiten setzt eine strenge Linearität zwischen Öffnungszeit des Stellgliedes und Dosiermenge voraus. Für kurze Impulszeiten ist diese strikte Abhängigkeit nicht gegeben (vgl. Abb. 29). Bleibt die Impulsbreite konstant, d.h. unabhängig von der Rückführung des Reglers, so wird pro Impuls stets eine gleichbleibende Menge zudosiert.
Werden dazu nichtstetige Regler ohne Rückführung verwendet, deren Ausgangssignale externe Taktgeber in festeinstellbare Impuls- und Pausenzeiten auflösen, so kann dadurch einerseits eine Anpassung an die Regelstrecke und andererseits eine konstante Impulsbreite erreicht werden.
Der ideale Regler, der eine genaue Verbrauchsregistrierung erlaubt, sollte eine PID-Rückführung aufweisen, die nur auf die Schaltfrequenz, nicht hingegen auf die Impulsbreite wirkt.

In Abb. 18 sind Dosierimpulse eines Impulsreglers, eines Dreipunktreglers mit extern getaktetem Ausgangssignal und eines Impulsreglers mit konstanter Impulsbreite wiedergegeben.

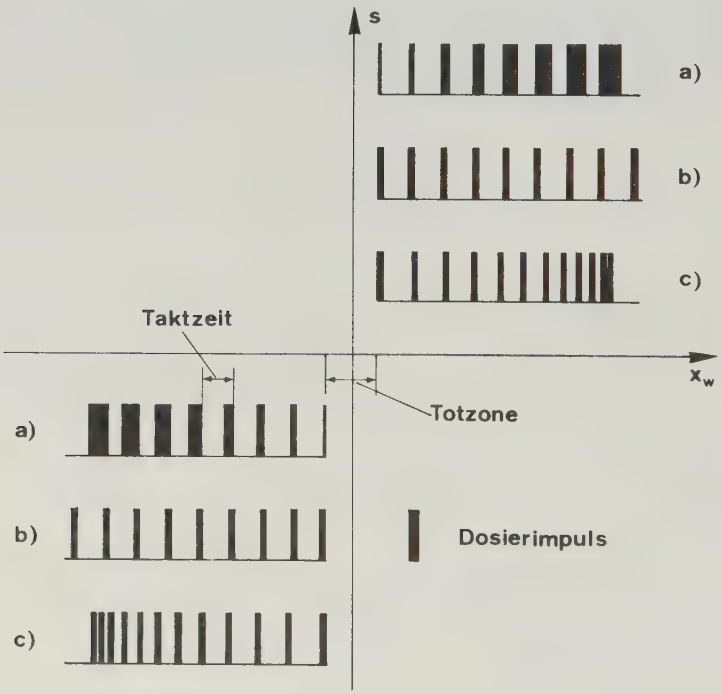


Abb. 18: Dosierimpulse verschiedener Reglertypen bei positiver bzw. negativer Regelabweichung:
a) Impulsregler mit PID-Verhalten, b) Dreipunktregler mit extern getaktetem Ausgangssignal und c) Impulsregler mit konstanter Impulsbreite

III. FERMENTER-DESIGN

Bei der im folgenden beschriebenen Fermentationsanlage handelt es sich um die Original-Fermenterkessel Typ b20 der Firma Giovanola Frères SA, Monthey, Schweiz. Die Peripherie, d.h. die Medienversorgung und die Instrumentierung, wurde im Eigenbau erstellt. Der Kessel mit unterer Rührwellendurchführung ist zusammen mit dem Antriebsmotor auf eine freistehende Konsole montiert. Das Fermentationsgefäß besitzt einen Doppelmantel, der zur in-situ-Sterilisation und zur Thermostatisierung während des Betriebes dient. Um die Wärmeabstrahlung - vor allem während der Sterilisation - zu reduzieren, ist der Kessel von einem Isolationsmantel umgeben.

Die Leitungen für Luft, Wasser, Abwasser, Dampf und Kondensat sind in einem aus Systemteilen gefertigten Regal untergebracht, das zugleich die notwendige Abstellfläche für Vorlagegefäße, Pumpen etc. bietet. Die verschiedenen Medien lassen sich über flexible Schlauchleitungen und Schnellkupplungen mit dem Fermenter verbinden.

Die Meß- und Regeleinheiten sind räumlich getrennt in einem fahrbaren 19"-Normschrank eingebaut. Die Meßleitungen der einzelnen Regelkreise und die Reglerausgänge sind auf der Frontseite des Instrumentenschrankes über Steckerkupplungen anschließbar. Durch die räumliche Trennung der Kontrolleinheiten wird deren Störung oder Beschädigung durch Hitzeeinwirkung während der Sterilisation oder durch Kondenswasser an den Rohrleitungen verhindert.

Das Umrüsten auf verschiedene Rühr- und Belüftungssysteme ist möglich. Dank dem Untenantrieb steht die gesamte Deckelfläche für Meß-Sonden und Medienanschlüsse zur Verfügung.

Der Kessel ist aus rostfreiem Stahl (Werkstoff-Nr. 1.4435) gefertigt. Für die Betrachtung des Innenraumes benötigt man daher eine Beleuchtungseinrichtung mit Schauglas. Die Lichtquelle (Autoscheinwerfer, 12 V, in Alu-Gehäuse) liegt oberhalb eines in den Fermenterdeckel eingebetteten temperatur- und druckbeständigen Glases. Aus gleichem Material besteht

das Schauglas, das mittels eines Wischers von festgewachsenen Organismen befreit werden kann.
Am Unterteil des Kulturgefäßes ist ein Probenahmeventil angebracht. Es erlaubt einerseits die Entnahme steriler Proben und kann andererseits zum Entleeren des Kesselinhalts bei Betriebsende benützt werden (vgl. III.5.).
Der Deckel dichtet im Flansch mit einem O-Ring. Mit dem eingelegten dreiteiligen Spannring, der mit einer Schraube gesichert wird, ist der Deckel im Flansch fixiert.
Alle Dichtungsstellen der zerlegbaren Teile am Fermenter sind mit O-Ringen ausgestattet. Solange diese keine Bruchstellen durch Alterung oder durch mechanische Beschädigung aufweisen, ermöglichen sie selbst in Langzeitversuchen einen sterilen Betrieb. Die O-Ringe sollten regelmäßig mit einer temperaturbeständigen Siliconpaste neu eingefettet werden.

Der Deckel enthält die für den Betrieb des Fermenters erforderlichen Normstutzen. Diese Stutzen sind genormte und toleranzhaltig bearbeitete Teile, die eine höchst flexible Ausrüstung erlauben. Das Grundelement dieser Normstutzen ist im Deckel verschraubt (Vgl. Abb. 20) oder seitlich in den Unterteil des Kessels eingeschweißt. Je nach Verwendung können sie mit einem Membranverschluß ausgerüstet werden, oder sie dienen dem Einbau des Rückflußkühlers und der verschiedenen Sensoren für in-situ-Messungen. Bei Nichtgebrauch werden sie mit einem Blindzapfen verschlossen.

Abb. 19: Fermenter System "Intensor" der Giovanola Frères SA, Monthey/Schweiz. 1, Leitkörper; 2, Propellerpumpe; 3, Doppelmantel; 4, Isolationsmantel; 5, Spannring; 6, Schauglas; 7, pH-Elektrode; 8, Lampe; 9, Sicherungsschraube; 10, Anschlüsse für Temperaturkreislauf; 11, Temperaturfühler; 12, Zuluftrohr; 13, Probenahme- bzw. Ablass-Ventil.

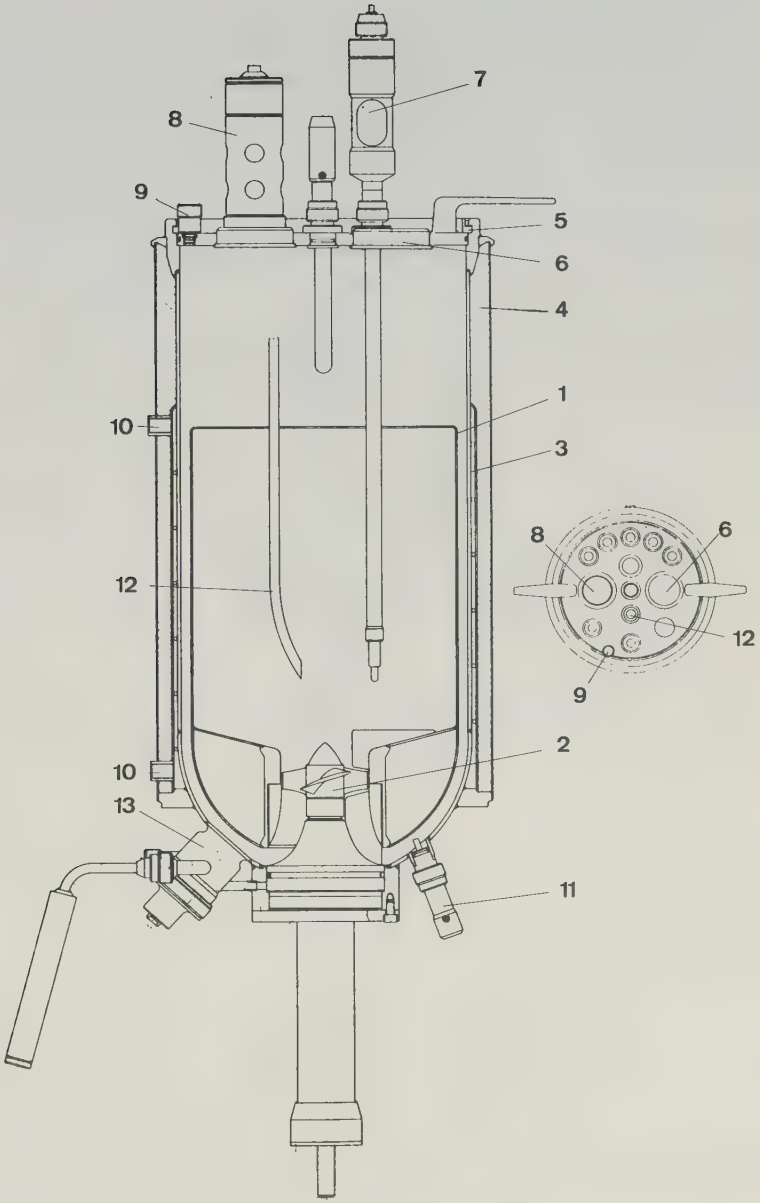


Abb. 19

1. Membrananschlußtechnik

Der Membrananschluß (41) erlaubt den sicheren und risikolosen Zusammenschluß zweier steriler Teile. Dadurch ist es möglich geworden, nachträglich, d.h. nach der Sterilisation oder während des Fermentationsprozesses, Anschlüsse an den Fermenter auszuführen oder auszuwechseln. Die Membran (Gummi) ist zwischen Normstutzen und einem zylinderförmigen Ring (Becher) so eingespannt, daß ihre Oberfläche durch das Abbrennen von Alkohol einwandfrei erhitzt werden kann, worauf sie mit der im Autoklaven sterilisierten Anstechnadel durchstoßen wird. Jeder steril anzuschließende Teil (Korrekturmittel, Luftfilter) endet daher mit einer Hohlnadel,

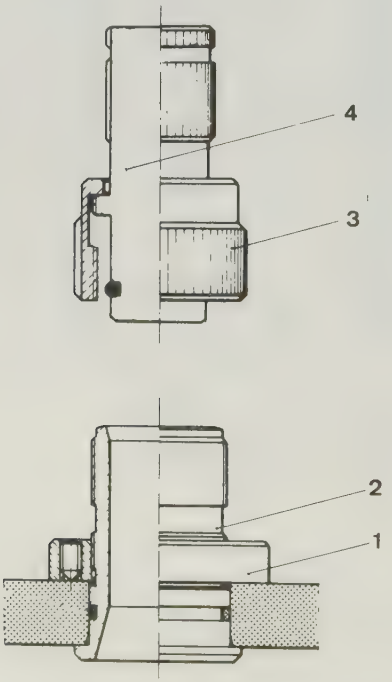


Abb. 20: Normierter Anschlußstutzen mit Blindverschluß. 1, Ringmutter; 2, Normstutzen; 3, Überwurfmutter; 4, Blindzapfen.

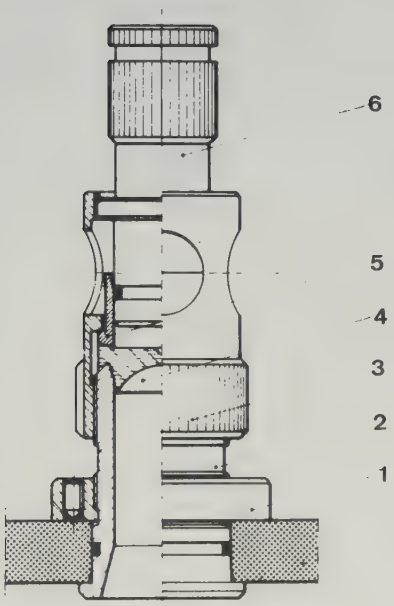


Abb. 21: Membranverschluß mit Sicherungszapfen. 1, Ringmutter; 2, Normstutzen; 3, lange Mutter; 4, Membran; 5, Becher; 6, Blind- bzw. Sicherungszapfen.

die zur Sterilisation mit einer entsprechenden Haube (Sterilhülse) versehen wird. In den Abb. 20 bis 23 ist dieses Anschlußsystem in seinen Einzelheiten wiedergegeben. Es geht daraus hervor, daß bei der Sterilisation des Fermenters die mit Membranen versehenen Stutzen stets mit eingeschraubten Blindzapfen gesichert sein müssen.

Für den Membrananschluß haben sich in der Fermentationsindustrie zwei Normgrößen bezüglich der Nennweite der Normstutzen durchgesetzt, nämlich: ∅ 19 mm und ∅ 25 mm.

Der Normstutzen für das Belüftungsrohr weist am oberen Rand eine Aussparung auf, in die das Gegenstück am Auflagering des Belüftungsrohres eingeführt wird. Damit ist gewährlei-

stet, daß die Luftaustrittöffnung genau vertikal über der Pumpenflügelspitze zu liegen kommt (Vgl. Abb. 19.).
Um bei der Sterilisation die Bildung eines Luftpolsters im Rohrinnern zu verhindern, sind Entlüftungslöcher angebracht.

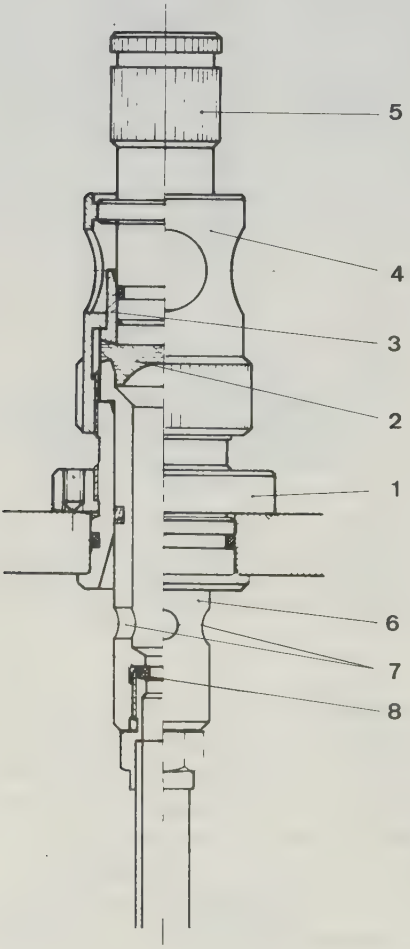


Abb. 22: Normstutzen mit eingebautem Belüftungsrohr. 1, Ringmutter; 2, Membran; 3, Becher; 4, lange Mutter; 5, Blindzapfen; 6, Belüftungsrohr; 7, Entlüftungslöcher; 8, O-Ring zur Abdichtung der Hohlnadel.

Die Hohlnadel des Zuluftfilters ragt so weit in das Belüftungsrohr hinein, daß sie durch den O-Ring im Rohrinnern dicht umschlossen wird.

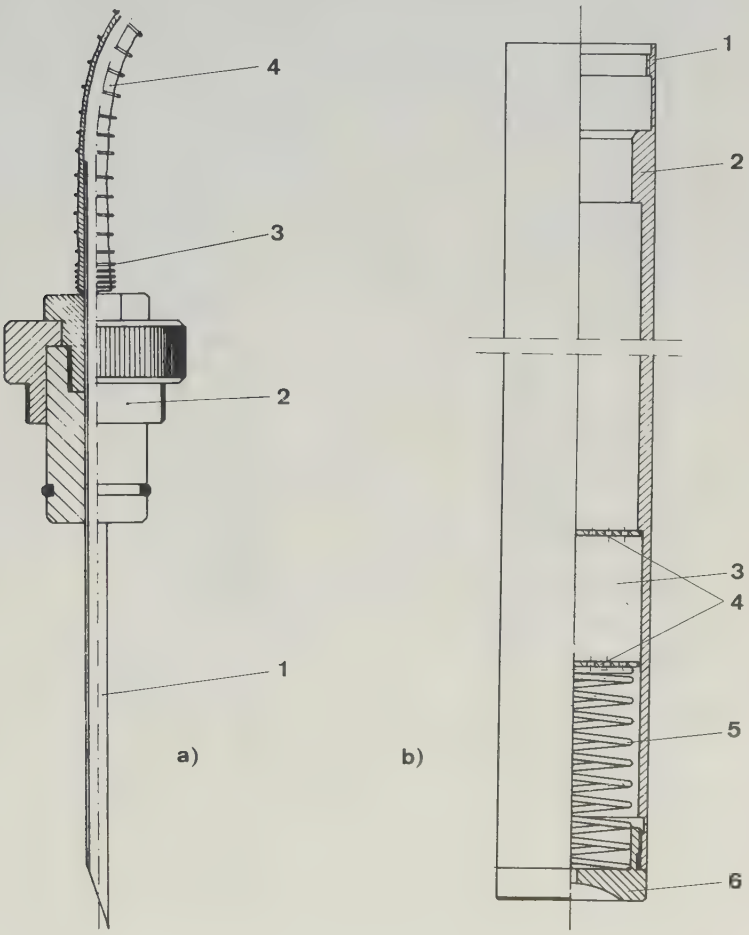


Abb. 23: a) Anstechnadel (Eigenbau). 1, Hohlnadel; 2, Überwurfmutter; 3, Stützfeder; 4, Schlauch.
b) Sterilhülse (für alle Stechanschlüsse). 1, Hülse; 2, Dichtfläche für O-Ring; 3, Glasseide-Sterilfilter; 4, perforierte Platten; 5, Feder; 6, Deckel.

Sämtliche Armaturen werden nach Durchstoßen der Gummimembran im oberen Gewinde der Überwurfmutter festgeschraubt. Durch diese Drehbewegung werden die Schläuche an den Anstechnadeln verdreht. Es wurde deshalb eine Anstechnadel im Eigenbau gefertigt, die mit einer frei drehenden Überwurfmutter verse-

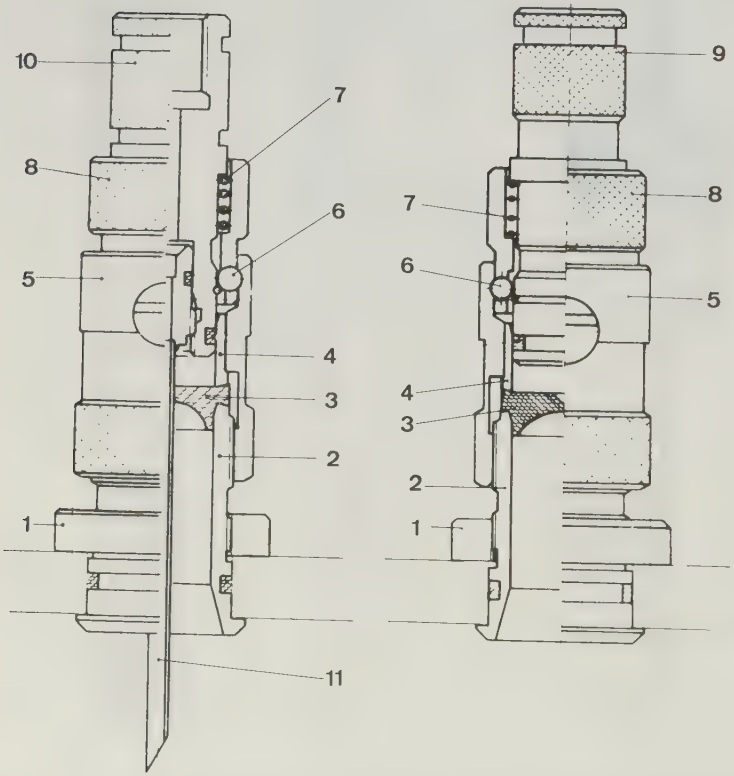


Abb. 24: Schnellverschluß-System der Giovanola Frères SA, Monthey/Schweiz.
1, Ringmutter; 2, Normstutzen; 3, Membran; 4, Becher; 5, lange Mutter; 6, gehärtete Kugel; 7, Feder; 8, zwangsläufige Kugelverriegelung; 9, Blindzapfen; 10, Anschlußzapfen; 11, Hohlnadel.

hen ist. Ein weiterer Vorteil dieser selbstgefertigten Nadel besteht darin, daß die Kanüle von der oberen Schlauchtülle bis zur Spitze nahtlos geführt ist, sodaß sich keine Säuren- oder Laugenreste in Verschraubungen festsetzen können. Diese würden bei der Erhitzung im Autoklaven die Metallteile angreifen.
Die Stützfeder um den Schlauch verhindert dessen Abknicken.
Der neu entwickelte Schnellverschluß der Firma Giovanola Frères SA, Monthey, Schweiz, erlaubt die Fixierung von Anstecharmaturen ohne Gewindeverschraubung. Der Normstutzen bleibt in seiner Bauform unverändert. Anstelle des Gewindes im oberen Teil der Überwurfmutter und der Sterilhülse befindet sich eine Nut zum Einrasten des Schnellverschlusses.

2. Einbau von Sensoren

Unabhängig von der Art der Messung, werden alle Sensoren prinzipiell gleich eingebaut. Dazu dienen - wie schon erwähnt - die Normstutzen mit 19 mm bzw. 25 mm Nennweite.
Der Sensor wird dabei so weit durch den Stutzen geschoben, bis der Auflagering auf diesen zu liegen kommt. In dieser Lage wird der Sensor mittels einer Überwurfmutter fixiert.
Die Dichtstelle besteht jeweils aus einem in einer Nut des Sensorschaftes liegenden O-Ring.
Eine andere Art für den Sensoreinbau - sie ist vor allem bei Anlagen amerikanischer Provenienz anzutreffen - ist das Einschrauben des Fühlers in ein 3/4" NPT-Gewinde. Da dieses Gewinde konisch ist, erfolgt die Dichtung durch das Gewinde selber. Auf einen O-Ring kann daher verzichtet werden. Nachteilig auf den NPT-Gewinde-Einbau wirken sich die Eigenheiten rostfreier Stähle aus. Diese sind weich und neigen zum "Anfressen". Da die Dichtung durch das Gewinde zustande kommt, muß dieses - im Gegensatz zu dem am Normstutzen - festgezogen werden, wodurch es unweigerlich festsitzt. Dies erhöht den Arbeitsaufwand bei Ausbau und Reinigung enorm.

Die Positionierung der Sensoren ist bei Normstutzen prinzipiell frei wählbar. Einschränkungen sind nur durch den Aufbau der Sensoren und deren Meßaufgabe gegeben. Der seitliche Einbau bringt den Vorteil kurzer Einbaulängen und wird bevorzugt bei größeren Anlagen verwendet.
Position und Einbaulage der einzelnen Meßfühler sind jeweils in den entsprechenden Kapiteln ausführlicher beschrieben.

3. Wechselsonde

Sensoren können während der Fermentation durch die Wirkung der Mikroorganismen (z.B. Anwachsen an Membranen) wie auch von Substratanteilen (vgl. III.9.3.1.) in ihrer Meßfähigkeit beeinträchtigt werden. Durch den Einbau von Wechselsonden wird es möglich, Betriebsunterbrüche wegen Regelunfähigkeit zu vermeiden.
Neu entwickelte Wechselsonden, die periodische Kontrollen, Reinigung und eventuellen Ersatz der Elektrode während des Betriebes ohne Kontaminationsrisiko ermöglichen, sind in Abb. 25 und Abb. 26 dargestellt. Diese Armaturen sind für den seitlichen Einbau des Meßgebers konzipiert und bestehen aus einer Schleuse und einem Auszug.
In beiden Abbildungen sind die Wechselsonden mit pH-Elektroden bestückt. Sie eignen sich ebenfalls für den Einbau der IL-pO_2-Elektrode. In Zukunft werden sie sicher noch für andere Meßgeber Anwendung finden.
Zur Sterilisation der Sensoren können nebst Dampf auch flüssige und gasförmige Agentien verwendet werden. Die chemische Entkeimung erlaubt den Einsatz von nicht dampfsterilisierbaren Sensoren.
Zum Auswechseln der Elektrode wird beim System "Ingold" der Auszug bis zum Anschlag ausgezogen und die Schleuse mit dem Kugelventil gegen den Fermenterinhalt abgesperrt (vgl. Abb. 25b). Nach dem Wiedereinbau der kontrollierten oder erneuerten Elektrode wird sie in der ausgezogenen Stellung steri-

lisiert. Anschließend wird das Kugelventil geöffnet und der Meßgeber eingeschoben (vgl. Abb. 25a). Diese Wechselsonde ist mit drei Sicherheitsvorrichtungen ausgestattet:

- Die Elektrode kann durch unsachgemäßes Manipulieren beim betriebsmäßigen Ein- und Ausfahren durch die Schleuse nicht beschädigt werden.
- Das Kugelventil kann nur in vollständig ausgezogenem Zustand geschlossen werden.
- Der Auszug kann nur bei geschlossenem Kugelventil ganz aus der Schleuse herausgezogen werden.

Beim System "Giovanola" erfolgt der Ein- bzw. Ausbau des Meßgebers mit Hilfe einer Spindel. Als Schleuse findet ein Hohlzylinder, der über einen mit einem O-Ring versehenen Deckel geschoben werden kann, Verwendung. Auf zusätzliche Sicherheitsvorrichtungen kann in diesem System verzichtet werden, da Fehlmanipulationen, die eine Beschädigung der

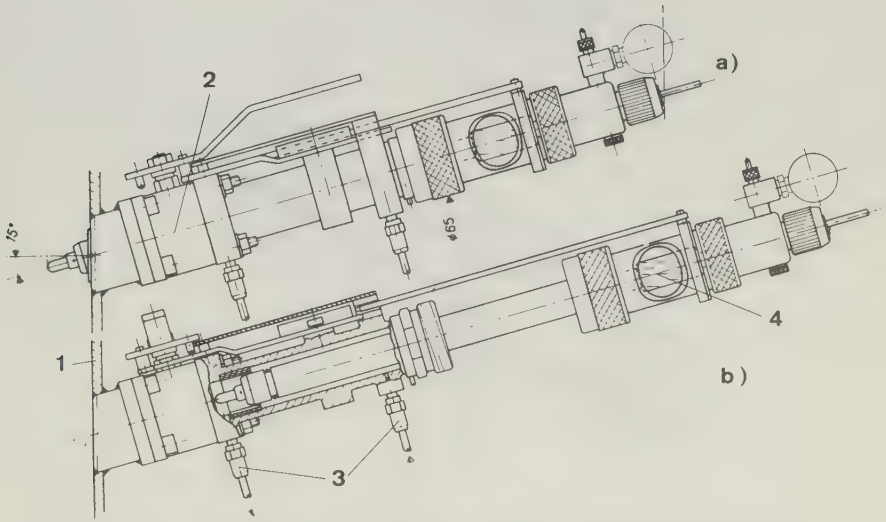


Abb. 25: Wechselsonde der Dr. W. Ingold AG, Urdorf/Schweiz, mit pH-Elektrode: a) in Meßstellung, b) in ausgezogener Stellung. 1, Kesselwand; 2, Kugelventil; 3, Anschlüsse für Sterilisation; 4, pH-Elektrode.

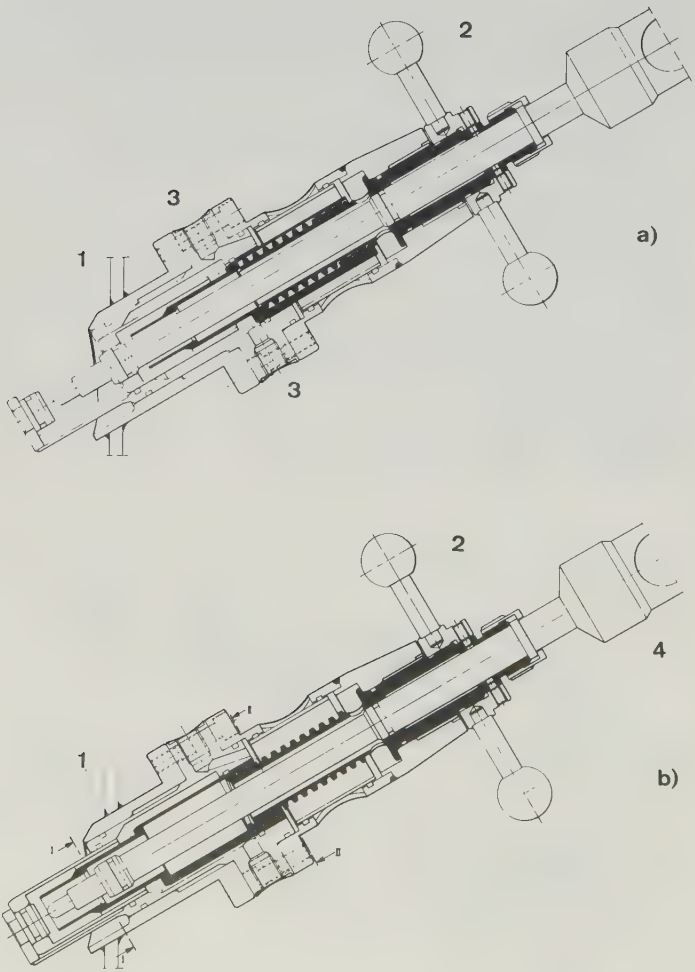


Abb. 26: Wechselsonde der Giovanola Frères SA, Monthey/ Schweiz, mit pH-Elektrode: a) in Meßstellung, b) in ausgezogener Stellung. 1, Kesselwand; 2, Spindel; 3, Anschlüsse für Sterilisation; 4, pH-Elektrode.

Elektrode verursachen würden, ausgeschlossen sind. Es sollte hingegen beachtet werden, daß die Elektrode nur bei geschlossener Schleuse ausgebaut werden darf.
Als Nachteil dieses Types wäre eventuell das Totvolumen, das durch den erhöht angebrachten Auslauf entsteht, aufzuführen.

4. in-situ-Reinigung von Sensoren

Wie schon erwähnt, können Sensoren, vor allem membranbestückte, durch das Anwachsen von mycelbildenden Organismen für die jeweilige Messung ausfallen. Dieser Fall trat immer

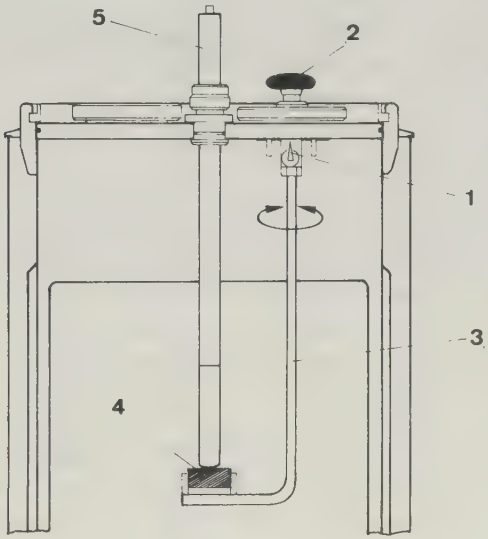


Abb. 27: in-situ-Reinigungseinrichtung für Sensoren (Eigenbau). 1, Scheibenwischer; 2, Drehknopf; 3, Gestänge; 4, Silicon-Abstreifer; 5, Sauerstoffelektrode.

wieder bei pO_2-Feeding-Versuchen ein, so daß diese abgebrochen werden mußten. Mit einer einfachen, im Eigenbau entwickelten Reinigungseinrichtung kann die festgewachsene Mycelmasse von Zeit zu Zeit abgestreift werden. Damit sind Langzeitversuche bis zu 600 Stunden möglich geworden (60). Das Gestänge des Abstreifers verfügt über keine eigene Dekkeldurchführung, sondern ist an der Achse des Scheibenwischers befestigt. Als Abstreifer dient ein weicher Silicongummi, der die Membran der Sauerstoffelektrode nicht verletzen kann (vgl. Abb. 27.).

5. Probenahmesystem

Ein gutes Probenahmesystem sollte einfach und schnell zu bedienen sein, um steril eine repräsentative Probe des Fermenterinhaltes zu ziehen.
In Fermentationen mit Bakterien und anderen einzelligen Organismen bereitet aufgrund ihrer geringen Größe und der niedrigen Viskosität der Kulturflüssigkeit das Probenehmen keine Probleme. Schwierigkeiten entstehen hingegen bei Pilzkulturen. Um eine Entmischung von Trägerflüssigkeit (Kulturmedium) und suspendiertem Material (unlösliche Mediumsbestandteile, Pellets und filamentöse Organismen) zu verhindern, sollte die Fließgeschwindigkeit der Probe im Entnahmesystem mit der der Kultur im Kessel identisch sein. Daher sollte dieses System keine Verengungen aufweisen, die lichte Weite relativ groß ausgelegt werden und die Entnahme aus einer gut gemischten Zone erfolgen.
Zur Verhinderung einer Kontamination des Fermenterinhalts darf die Entnahmevorrichtung keine toten Zonen aufweisen und sollte separat sterilisierbar sein. Der Volumenfehler durch häufiges Probenehmen - der vor allem bei Kleinfermentern ins Gewicht fällt - kann durch Systeme, die keinen Vorlauf erfordern, vermindert werden. Eine ideale Lösung dieses Problemkreises zeigt das in Abb. 28 wiedergegebene Pro-

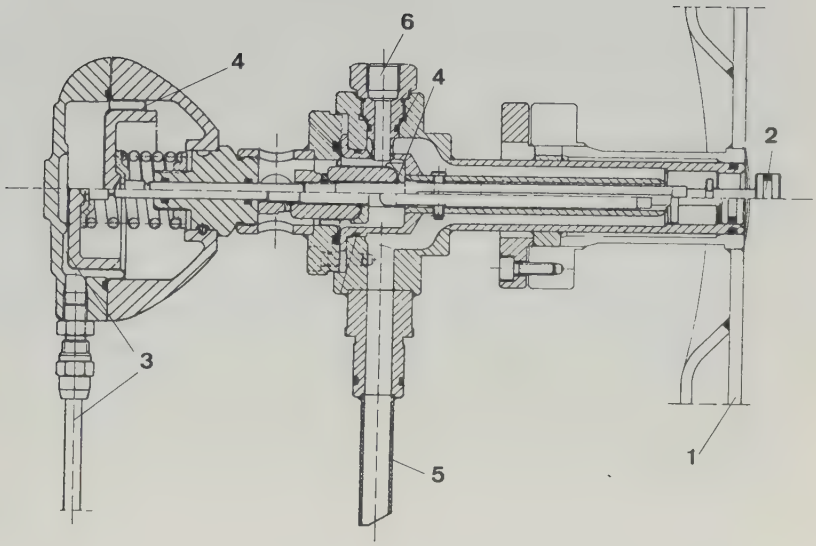


Abb. 28: Probenahmeventil. 1, Kesselwand; 2, Öffnungsbolzen; 3, pneumatischer Antrieb; 4, Roll-Membranen; 5, Auslaßöffnung (wird bei der Sterilisation mit einer Sterilhülse versehen); 6, Dampfeinlaß.

benahmeventil der Firma Giovanola Frères SA, Monthey/Schweiz.

Das Probevolumen kann durch eine an einem abfallverzögerten Relais vorwählbare Öffnungszeit eingestellt werden. Diese Anordnung läßt sich zu einem späteren Zeitpunkt ohne weiteres zu einer automatischen Probenahmeeinrichtung erweitern.

6. Stellglieder

Die Regelung bestimmter Prozeßparameter wie pH, Schaumhöhe, Substratkonzentration etc., beruht auf der Zugabe von Korrekturlösungen ins Reaktionsgefäß. Die Dosierung über die vom entsprechenden Regler angesteuerten Stellglieder hat unter absolut sterilen Bedingungen zu erfolgen, d.h. Vorratsgefäß, Stellglied und Schlauch- oder Rohrleitung müssen sterilisierbar sein und einen sterilen Betrieb gewährleisten.
Es ist wünschenswert oder sogar notwendig, sowohl den zeitlichen Verlauf wie Menge der jeweiligen Korrekturmittel-Zugabe automatisch aufzuzeichnen. Durch das Anbringen der Vorratsgefäße auf Druckmeßgeber läßt sich der Inhalt kontinuierlich wiegen. Aus der Gewichtsabnahme, die auf einem Schreiber oder Drucker festgehalten wird, kann die Zugabe ermittelt werden.

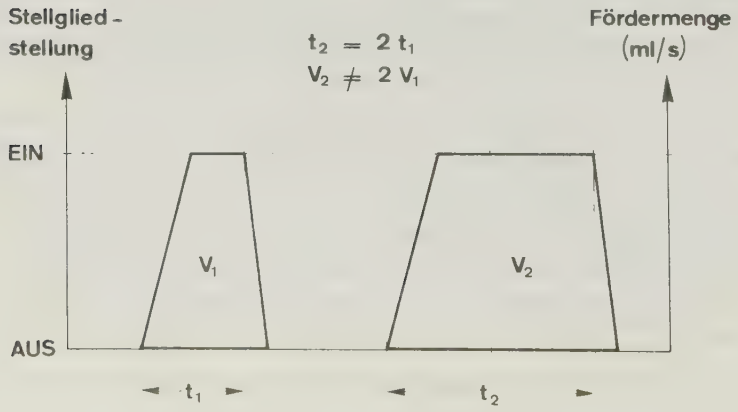


Abb. 29: Kennlinien von Stellgliedern (Absperrventil, Schlauchpumpe) bei impulsweiser Dosierung.

Eine weitere Methode besteht in der Integration der Impulszeiten mittels eines Umformers (vgl. III.7.1.). Dies setzt jedoch eine strenge Linearität zwischen Impulszeit und Dosiervolumen voraus.
Betrachtet man die beiden Dosiervolumina in Abb. 29, die durch Integration der Impulspeaks dargestellt werden können, so ist ersichtlich, daß $V_2 \neq 2\ V_1$ ist, obwohl sich die Impulszeiten wie 2 : 1 verhalten. Folglich ist die Verbrauchsregistrierung mittels Integration kurzer, variabler Impulszeiten, bedingt durch die EIN-AUS-Charakteristik des Stellgliedes, mit einem relativ großen Fehler behaftet. Bleibt die Impulsbreite hingegen stets konstant, so wird pro Impuls jeweils ein gleichgroßes Volumen dosiert. Dadurch ist die Linearität zwischen Gesamtimpulszeit und Korrekturmittelverbrauch erfüllt. Diese Art der Verbrauchsregistrierung erfordert daher entsprechende Regler, d.h. Regler mit konstanter, von der Regelabweichung unabhängiger Impulsdauer (vgl. I.2.2.2.).
Normalerweise weist der Fermenter einen über Atmosphärendruck liegenden Innendruck auf. Dieser baut sich einerseits durch den Strömungswiderstand am Abluftfilter auf, andererseits wird bewußt über ein Rückdruck-Regelventil ein Überdruck erzeugt, um den Sauerstoffpartialdruck zu erhöhen, der Schaumentwicklung entgegenzuwirken und um beim Auftreten kleiner Lecks, Infektionen vorzubeugen. Das Einbringen von Korrekturlösungen erfordert deshalb eine Überwindung dieses Druckgefälles.
Die Zugabe mittels Absperrventilen verlangt ein Druckgefälle in umgekehrter Richtung, d.h. vom Vorratsbehälter zum Fermenter. Dies kann am einfachsten dadurch erreicht werden, indem diese Behälter oberhalb des Fermenters angebracht und zusätzlich über eine Druckausgleichsleitung mit dem Fermenterinnenraum verbunden werden. Der Differenzdruck ist dann gleich dem statischen Druck der Flüssigkeitssäule im Vorratsgefäß und variiert mit deren Höhe, die ihrerseits eine Funktion des Korrekturmittelverbrauchs ist. Durch diese Anordnung ist eine genaue, reproduzierbare Dosierung

nicht möglich, da diese sowohl eine konstante Druckdifferenz wie eine konstante Öffnungszeit des Ventils verlangt. Diese Vorratsgefäße weisen aber den Vorteil auf, daß sie kein zusätzliches Luftfilter für den Volumenausgleich benötigen.

Durch Überlagerung der Vorratsgefäße mit Sterilluft konstanten Druckes kann ein gleichbleibender Differenzdruck eingestellt werden, solange der Innendruck des Fermenters unverändert bleibt. Variiert letzterer während des Prozesses, benötigt man für die Drucküberlagerung der Vorratsgefäße einen Differenzdruck-Regler, wie er in Abb. 42 dargestellt ist. Diese Anordnung erlaubt eine genaue, vom Kesselinnendruck unabhängige Dosierung und empfiehlt sich vor allem für größere Anlagen.

Ein anderes Verfahren, diesem Druckgefälle entgegenzuwirken, besteht in der Verwendung von Pumpen. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, daß die Vorlagen nicht als Druckbehälter ausgelegt werden müssen. Da alle mit dem Medium in Berührung kommenden Teile sterilisierbar sein müssen und

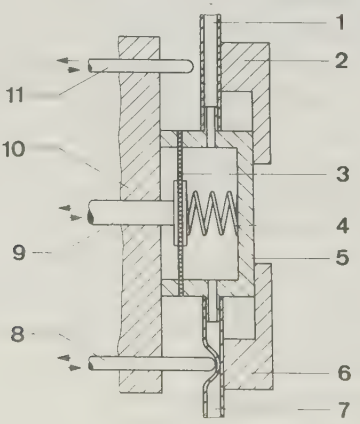


Abb. 30: Prinzipdarstellung einer Membran-Dosierpumpe der B. Braun Melsungen AG, Melsungen. 1, Druckleitungsschlauch; 2, obere Druckplatte; 3, Membran; 4, Rückholfeder; 5, Pumpenkopf; 6, untere Druckplatte; 7, Saugleitungsschlauch; 8, Saugventilstössel; 9, Membranstössel; 10, Anschlußplatte; 11, Druckventilstössel.

auch über längere Zeit einen sterilen Betrieb garantieren müssen, kommen nur wenige Pumpen-Typen infrage. Bei Schlauchquetschpumpen kann der Schlauch samt Vorlagegefäß und Anstechnadel im Autoklaven sterilisiert werden. Bei stark dimensioniertem Antriebsmotor fördert sie in den üblichen Druckbereichen unabhängig von deren Schwankungen. Durch Alterung und mechanische Beanspruchung verändert sich der Schlauchquerschnitt im Pumpenkopf, was zu ungenauer Dosierung führt. Sie eignen sich deshalb schlecht in Langzeitversuchen wie etwa der kontinuierlichen Fermentation. Durch eine saubere Schlauchführung kann jedoch die Lebensdauer der Schläuche und die Reproduzierbarkeit erhöht werden. Der Reinigungsaufwand ist sehr gering.
Membranpumpen eignen sich aufgrund ihrer hubweisen Förderung ausgezeichnet zur impulsweisen Dosierung von Lösungen. Bei der in Abb. 30 wiedergegebenen Pumpe handelt es sich um eine Membranpumpe, bei welcher der Pumpenkopf samt Vorlage und Anstechnadel für die Sterilisation im Autoklaven demontiert werden können. Je nach der pro Impuls zu fördernden Menge können Pumpenköpfe verschiedenen Hubvolumens (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 und 1.0 ml) eingesetzt werden. Die Ventile arbeiten zwangsgesteuert nach dem Prinzip abgequetschter Schläuche und sind daher nicht anfällig für Verstopfungen und Undichtigkeiten. Als Antriebsorgan für Membran und Ventile dient ein kollektorloser Gleichstrommotor, dessen Drehzahl elektronisch geregelt wird. Die Pumpe kann sowohl intern wie extern gesteuert werden.
Bei langsamer oder impulsweiser Förderung von Partikelsuspensionen stellt sich das Problem der Sedimentation dieser Partikel in der Rohr- oder Schlauchleitung, was zu einer Entmischung führt. Zudem treten oft Verstopfungen von Ventilen oder Ablagerungen in Ventilsitzen auf. Bei dem in Abb. 31 gezeigten Dosierventil, es handelt sich um eine Neuentwicklung der Firma Infors AG, Binningen/Schweiz, werden diese Schwierigkeiten dadurch beseitigt, daß das Dosierventil in den Boden des gerührten Vorlagebehälters eingebaut wird. Wichtig ist dabei, daß der Behälter oberhalb des Ein-

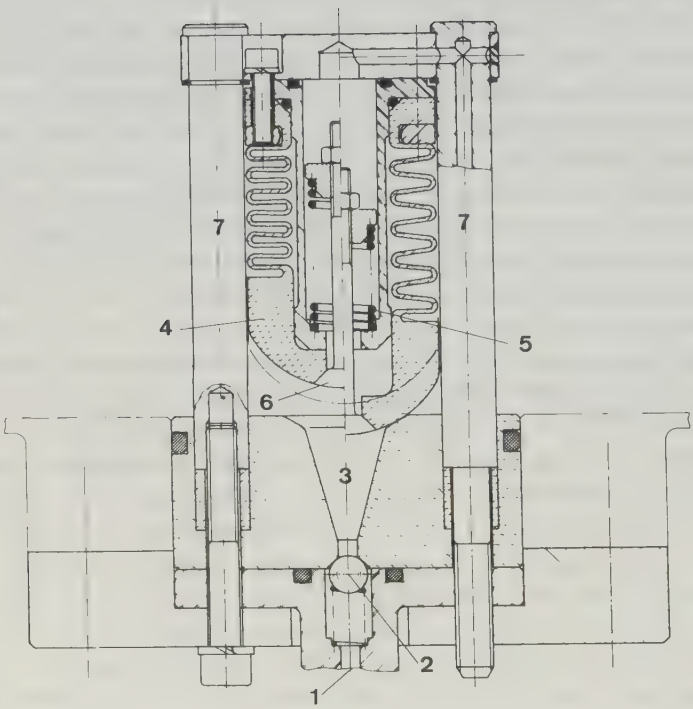


Abb. 31: Dosierventil der Infors AG, Binningen/Schweiz, 1, Zuleitung in den Fermenter; 2, Rückschlagventil; 3, Meßraum; 4, verschiebbares Organ; 5, Feder; 6, Öffnung des Überdruckventils; 7, Säulen für Halterung.

laßventils am Fermenter angebracht wird. Nach jeder Dosierung, die in einzelnen gleichgroßen Schritten erfolgt, wird die Zuleitung in den Fermenter entleert. Das Dosierventil ist dadurch gekennzeichnet, daß es einen im unbetätigten

Zustand gegen das Behälterinnere offenen, gegen außen durch ein Rückschlagventil geschlossenen Meßraum aufweist, der gegen das Behälterinnere durch ein mittels eines Druckmediums (sterile Druckluft) entgegen der Kraft einer Feder verschiebbares Organ abschließbar ist. Dieses verschiebbare Organ ist seinerseits Wandungsbestandteil eines durch das Druckmedium vergrößerbaren Hohlkörpers, der eine durch ein Überdruckventil verschlossene Öffnung aufweist. Diese Öffnung steht dann vor dem Meßraum, wenn dieser durch das Organ verschlossen ist. Die Anordnung ist so dimensioniert, daß sich das Überdruckventil erst öffnen kann, wenn das federbelastete Organ den Meßraum abgeschlossen hat. Durch dieses Dosierventil ist es möglich geworden, Partikelsuspensionen unentmischt und genau zu dosieren. Auch hochviskose Lösungen können in einzelnen gleichgroßen Mengen zugegeben werden, wenn für das Entleeren und Nachfüllen des Meßraumes genügend lange Zeitintervalle eingerechnet werden.
Für klare Lösungen wäre es denkbar, dieses Ventil in einer kleineren Ausführung zu bauen, wobei die beiden Säulen für die Halterung des verschiebbaren Organs durch einen Zylinder ersetzt werden müßten. Zusätzlich müßte es mit einer Anstechnadel versehen werden, damit es in einen Membrananschluß auf dem Fermenterdeckel montierbar ist.

7. Instrumentierung

Die Meß- und Regeleinrichtung jedes einzelnen Regelkreises sind separat in einem 19"-Einschub untergebracht. Dieses Modul-System hat den Vorteil, daß die Regeleinrichtungen für Unterhaltsarbeiten leicht zugänglich sind. Sie lassen sich bei Ausfall unter den einzelnen Fermentern austauschen und sind zu einem späteren Zeitpunkt leicht modifizierbar oder weiter ausbaufähig.
Die analoge Datenregistrierung erfolgt für jeden Fermenter zentral auf einem 12-Kanal-Punktschreiber (Typ Polykomp 2,

Hartmann & Braun AG, Frankfurt/Main). Der Ablesefehler auf einer Schreiberbreite von 250 mm ist klein. Außerdem ist die Ablesung parallaxenfrei, was deren Genauigkeit erhöht.

Die gerätetechnische Entwicklung führte im Zuge der immer komplizierter werdenden Aufgaben bei der Automatisierung von Prozessen vom Regelgerät für einen einzelnen Regelkreis zu geschlossenen Regelsystemen. Darunter versteht man eine Reihe von aufeinander abgestimmten Geräten nach dem Baukastenprinzip, durch deren Kombination eine Vielfalt von Aufgaben verwirklicht werden kann. Das betrifft sowohl die Meßgeräte für die verschiedenen Betriebsgrößen als auch die Geräte zur Bildung des Regelsignals. Es wird damit eine bestimmte Standardisierung angestrebt.
Soweit es möglich und sinnvoll war, wurden in den einzelnen Regelkreisen Transmitter (Meßumformer) mit einem standardisierten Ausgangssignal von 0 - 20 mA verwendet. In diesen Stromkreis können Schreiber, Anzeigegeräte und Regler eingeschaltet werden.

7.1. Impuls-Geber und -Registrierung

Wie aus III.6. ersichtlich, ist für eine genaue Dosierung ebenfalls eine exakte Impulssteuerung erforderlich, die aber, um sie verschiedenen Stellgliedern und Prozessabläufen angleichen zu können, universell ausgelegt sein muß.

In einem 19"-Einschub sind 4 Zeitgeber-Einheiten untergebracht. Jede besteht aus einem Impuls-Pause-Geber, einer Impuls-Registrierung, einem elektromechanischen Impulszähler, einer Leuchtkalotte, die während des Impulssignals aufleuchtet, und einer Leuchttaste für den Speisestrom. Durch die zentrale Anordnung können diese Einheiten leicht den entsprechenden Regelkreisen zugeordnet oder bei Ausfall untereinander ausgetauscht werden.
Die Impuls-Pause-Steuerung übernimmt ein elektronischer Doppel-Timer (Typ DT 115, Dr. W. Ingold AG, Urdorf/Schweiz),

dessen Zeitmessung auf der Netzfrequenz basiert. Impuls- und Pause-Zeit lassen sich unabhängig voneinander auf der Frontplatte mittels Multiswitches digital in Sekundenschritten zwischen 0 ... 99 Sekunden kontinuierlich verstellen. Durch die elektronische Zeitmessung und die digitale Einstellung der Impuls-Pause-Zeit läßt sich trotz hoher Variabilität dieses Doppeltimers eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Taktfolge erzielen. Zur manuellen Zugabe kann eine Drucktaste, sie überbrückt die Pause-Zeit, betätigt werden.

Die Impuls-Registrier-Einheit (Typ CR 116, Dr. W. Ingold AG, Urdorf/Schweiz) weist als Ausgangs-Signal einen treppenförmigen Gleichstrom von 0 ... 20 mA auf, der auf den Schreiber geführt wird. Der Endwert dieses Signals entspricht der auf der Frontplatte mittels Multiswitches einstellbaren Gesamtimpulsdauer, die kontinuierlich in Minuten-Schritten zwischen 0 ... 99 Minuten variierbar ist. Diese verschiedenen Empfindlichkeitsstufen ermöglichen den universellen Einsatz, eine hohe Auflösung und durch die Digital-Vorwahl eine gute Reproduzierbarkeit. Das Ausgangssignal läßt sich durch eine Drucktaste auf den Nullwert stellen, was vor allem bei Prozeßbeginn vorgenommen wird.

Erreicht die treppenförmige Kurve, aus der sowohl der Zeitpunkt der Korrektur wie deren Größe ersichtlich ist, den rechten Schreiberrand (Endwert), springt das Signal jeweils automatisch auf den Nullwert zurück, sodaß der weitere Kurvenverlauf aufgezeichnet werden kann.

Der elektromechanische Impuls-Zähler registriert die Anzahl der Impulse unabhängig von deren Dauer. Er dient daher eher zur groben Kontrolle.

Die Leuchtkalotte zeigt durch ihr Aufleuchten die Korrekturimpulse an.

Die Netz-Leuchttaste ermöglicht das separate Ein- und Ausschalten der Zeitgeber-Einheit. Dadurch können die Relais-Kontakte vor unnötigem Verschleiß geschützt werden.

8. Überwachung physikalischer Parameter

8.1. Temperatur-Regelung

Der Wärmeaustausch erfolgt über den Fermenter-Doppelmantel. Zur Temperaturmessung dient ein doppeltes Widerstandsthermometer Pt 100 DIN, das in einen Normstutzen am Fermenterboden eingebaut ist. Eine Meßleitung führt zur Temperatur-Registrierung an den Schreiber, die andere zu deren Regelung an den Regler. Die Regelung beschränkt sich auf die der Inkubationstemperatur.

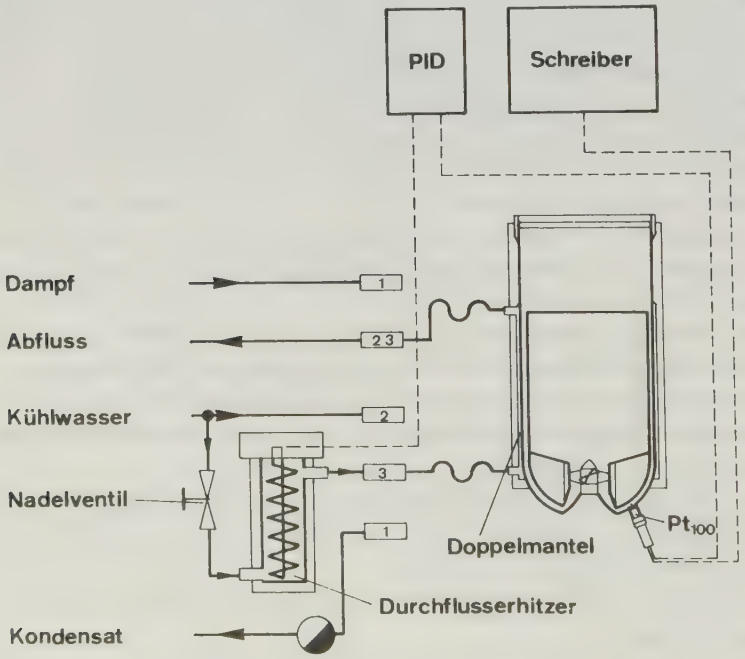


Abb. 32: Aufbau des Temperatur-Regelkreises

Die Medien für die verschiedenen Phasen, Sterilisation, Schnellkühlung und Inkubation, werden durch das Umstecken (Schnellkupplungen) von flexiblen Leitungen an den Fermenter geführt.
Für die Sterilisation werden die Fermenteranschlüsse mit den Schnellkupplungen (1) verbunden (vgl. Abb. 32). Der Dampfdruck wird in der Zuleitung über ein Handventil reduziert.

Die Schnellkühlung wird, wie schon erwähnt, durch das Umstecken an die Schnellkupplungen (2) eingeleitet. Kurz vor Erreichen der Inkubationstemperatur wird der eigentliche Regelkreis geschlossen (Anschluß an die Schnellkupplungen (3)) und der Regler eingeschaltet.
Mit einem Nadelventil läßt sich manuell ein konstanter Wasserdurchfluß einstellen, der den wechselnden Fermentationsbedingungen, d.h. der vom Fermenter abzuführenden Wärmemenge, angepaßt werden kann. Der durchschnittliche Wasserverbrauch liegt bei ca. 30 ... 40 1/h.
Fällt der Istwert unter den Sollwert, d.h. unter die gewünschte Inkubationstemperatur, schaltet der Regler den Durchflußerhitzer ein, der den Kühlwasserstrom erwärmt. Der Durchflußerhitzer wird über einen Triac zugeschaltet, der seinerseits über das Ausgangsrelais des Reglers gesteuert wird. Triacs haben den Vorteil, daß sie ohne mechanische Kontakte und somit verschleißfrei und geräuschlos arbeiten.

Der Regler weist folgende technische Daten auf:

- Typ	Bitric 96 W 1, Hartmann & Braun AG, Frankfurt/Main
- Prinzip	Spannungsvergleich, Gleichspannungsverstärker mit Transistormodulator PID-Verhalten
- Eingang	Widerstandsthermometer Pt 100 DIN
- Eingangsschaltung	Wheatstonesche Brücke, Speisung stabilisiert und linearisiert
- Sollwert-Einstellung	digital in 4 Dekaden
- Sollwertfehler	$\leq \pm$ 0.5 % vom eingestellten Sollwert

- Meßspanne	kontinuierlich einstellbar, z.B. 40 grd.
- Leitungsabgleich	bis zu 10 Ohm durch Abgleichelement
- Reproduzierbarkeit	
Schaltpunkte	$\pm$ 0.1 % bei Nennbedingungen
Schalthysterese	$\pm$ 0.25 %
- PID-Rückführung	x_p=0 ... 50 % der Meßspanne kontinuierlich einstellbar T_n=1 min bis 20 min in 8 Stufen einstellbar $\frac{T_n}{T_v}$=5.8=konst.
- Ausgang	1 Relais mit Wechsler, max. 250 V, max. 8 A.

Dieser Aufbau des Regelkreises garantiert eine sichere Temperaturregelung, da er praktisch keine mechanischen Elemente aufweist. Die Regelung arbeitet so genau, daß die Regelabweichungen innerhalb der Strichbreite des Schreibers liegen.

8.2. Durchfluß-Rate

8.2.1. Gase

Zur Messung und Regelung des Gasdurchsatzes (z.B. Liter/min) existieren verschiedene Systeme. Das einfachste und preisgünstigste besteht aus einem Rotameter (Schwebekörper in kalibriertem Rohr) zusammen mit einem Nadelventil. Um die Druckschwankungen in der Zuluftleitung zu eliminieren, wird vor das Dosierventil des Rotameters ein Druckregulierventil in die Rohrleitung eingebaut. Der Rotameter und Nadelventil liegen auf der Zuluftseite des Fermenters vor dem Luftfilter.

Für genauere Messungen empfiehlt sich ein Labor-Gasmesser der Firma H. Wohlgroth & Co., Zürich/Schweiz. Dieses Gerät besteht aus dem Gasmessergehäuse, der Meßtrommel und der

Zählvorrichtung. Die in Meßkammern eingeteilte Meßtrommel ist horizontal gelagert und taucht zum Teil in eine Sperrflüssigkeit (z.B. Wasser) ein. Die einströmende Luft versetzt die Meßtrommel in Drehung. Eine Trommelumdrehung entspricht einer bestimmten Gasmenge, wobei die Umdrehungen auf das Zählwerk übertragen werden. Die Höhe des Niveaus der Sperrflüssigkeit fixiert das Meßvolumen pro Trommelumdrehung. Der Flüssigkeitsspiegel wird mittels einer speziellen Kontrollvorrichtung (Stechpegel, Überlauf) eingestellt. Die Messung erfolgt bevorzugt an der Abluftseite des Fermenters nach dem Luftfilter. Die Meßgenauigkeit liegt zwischen +0.5 und -1.0 % (Angaben des Herstellers).
Für die Einstellung eines konstanten Luftdurchsatzes genügen die oben erwähnten Einrichtungen, sofern keine Druckschwankungen in der Zuleitung und im Fermenterinnenraum auftreten. Soll der Luftdurchsatz hingegen registriert und/oder geregelt werden, so erfordert dies aufwendigere Anlagen.
Die in Abb. 33 dargestellte Durchflußmeßstrecke beruht auf dem Wirkdruck-Verfahren. Bei diesem Meßverfahren wird die Abluft durch eine Meßblende, die zwischen zwei Flanschen in der Rohrleitung befestigt ist, geleitet. Der am Drosselgerät entstehende Wirkdruck h wird als Maß für den Durchfluß q benutzt. Der genaue Zusammenhang zwischen Durchfluß und Wirkdruck ist in DIN 1952 angegeben. Geht man davon aus, daß die Abluft an der Meßblende mit Wasserdampf gesättigt ist und einen mittleren CO_2-Gehalt von 3 Vol.% aufweist, der Druck etwa 1000 mbar und die Temperatur 25° C beträgt, ergeben sich folgende Fehler (Angaben des Herstellers):

Druck	1000 mbar ± 3 %	± 1.5 % Fehler
Temperatur	25° C ± 5° C	± 2 % Fehler
CO_2-Gehalt	3 Vol.% ± 3 Vol.%	± 0.8 % Fehler

Bei der Berechnung des Fehlers wurde jeweils Sättigung angenommen. Schwankungen der Gasdichte ergeben sich vor allem durch den unterschiedlichen CO_2-Gehalt. Es wurde bei der Fehlerberechnung ein bei Fermentern üblicher CO_2-Gehalt von 0 - 6 Vol.% berücksichtigt. Aus diesen Einzelfehlern ergibt

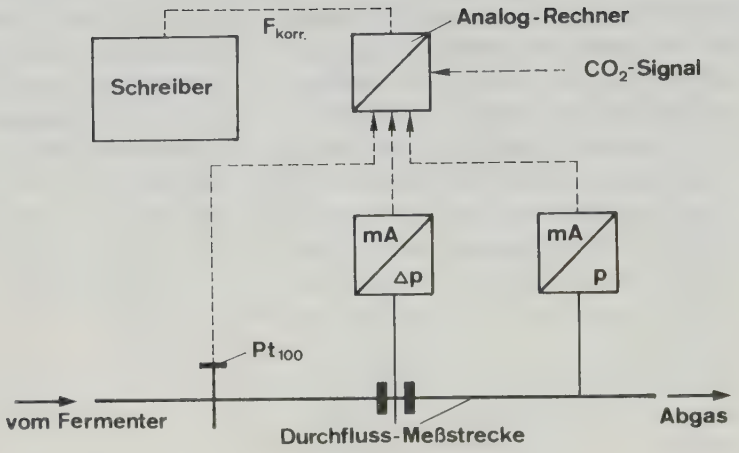


Abb. 33: Messung des Luftdurchsatzes nach dem Wirkdruck-Verfahren (Geräte der Hartmann & Braun AG, Frankfurt/Main).

sich ein mittlerer Fehler von $\pm$ 2.6 %.
Für eine genaue Messung von q muß daher zusätzlich die Dichte ρ des Mediums im Betrieb erfaßt und damit die Durchflußanzeige korrigiert werden. Wegen der Schwierigkeiten der Dichtemessung wird die Betriebsdichte ρ aus dem Druck p, der Temperatur t und bei Gasgemischen aus der Normdichte ρ_n errechnet.
Für die Messung des Luftdurchsatzes ist eine Meßstrecke für einen Durchsatz von 0 - 2000 1/h bezogen auf Normzustand (1013 mbar, 0° C) vorgesehen. Am Meßstreckeneingang ist ein Thermometer Pt 100 eingebaut. Über einen Niederdruck-Dreiweghahn mit den entsprechenden Schlauchverbindungen erfolgt der Anschluß zum CMR-Meßumformer mit Tauchglocken-Meßwerk (Differenzdruck 6 mbar, Ausgangssignal 0 - 20 mA). Ein weiterer CMR-Meßumformer mit Membrankörper-Meßwerk (Meßbereich 700 - 900 Torr, Ausgangssignal 0 - 20 mA), der nach der

Blende eingebaut wird, dient in Verbindung mit der Temperatur-Meßstelle zur Zustandskorrektur. Diese wird in einem CMR-Multiplizier-Rechengerät (analog) durchgeführt. Zur Korrektur des CO_2-Einflusses auf das Meßergebnis kann das Signal des CO_2-Analysators (vgl. III.9.3.4.) ebenfalls auf das Rechengerät gegeben werden. Da dieser Fehler relativ klein ist, wurde auf diese Korrekturschaltung verzichtet.
Über ein fest angeschlossenes Verbindungskabel wird der Durchfluß-Meßwert als eingeprägter Strom von 0 - 20 mA entsprechend der Durchflußmenge von 0 - 2000 l/h bezogen auf Normzustand auf den Schreiber gegeben. Dieses Signal kann zusätzlich zur Regelung des Luftdurchsatzes herangezogen werden. Für die gesamte Meßstrecke wurden Geräte der Hartmann & Braun AG, Frankfurt/Main, verwendet.
Für eine Regelung des Luftvolumens ließe sich ein Schrittregler in Kombination mit einem elektrischen Stellantrieb einsetzen (vgl. II.2.2.2.).

8.2.2. Flüssigkeiten

Wie schon erwähnt, können die Vorratsgefäße kontinuierlich gewogen und diese Signale registriert werden. Mittels eines Reglers, dessen Sollwert eine Funktion der Zeit ist, ließe sich eine bestimmte Durchfluß-Rate, z.B. für die kontinuierliche Fermentation, genau einstellen.
Eine konstante Durchfluß-Rate kann aber auch mit einer Steuerung erreicht werden unter der Bedingung, daß Stellglieder verwendet werden, die, unabhängig von kleinen Druckschwankungen (sowohl auf der Saug- wie auf der Druckseite), gleichmäßig fördern. Ideal sind hubweise arbeitende Stellglieder (vgl. III.6.) mit elektronisch gesteuerter Hubfrequenz. Diese Steuerung kann von einem Impulsgeber, wie er unter III.7.1. beschrieben ist, übernommen werden. Die Durchfluß-Rate läßt sich mit dieser Geräteanordnung reproduzierbar und genau, d.h. ohne Nacheichen, ein- und verstellen, wenn nur das Impulsintervall nicht aber die Impulsbreite verändert wird

(vgl. Abb. 29). Zur Anzeige des geförderten Volumens dient eine Impulsregistrierung (vgl. III.7.1.).

8.3. Schaum

Das Rühren und Belüften einer Submerskultur führt je nach Rührersystem, Zusammensetzung des Mediums und dem zeitlichen Stand der Fermentation (Autolyseprodukte nach fortgeschrittener Fermentation) zur Schaumbildung. Diese kann den Gasaustausch an der Oberfläche beträchtlich beeinflussen und im Extremfall den Fermenter zum Überschäumen bringen. Schaum-Überwachung und -Kontrolle kann durch folgende Methoden realisiert werden:

- Mechanische Zerstörung
- Chemische Antischaummittel (AS)
- Eine Kombination beider.

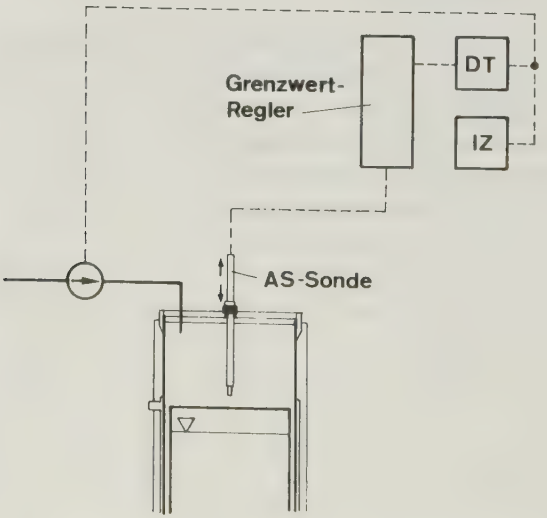


Abb. 34: Aufbau einer automatischen Schaumüberwachungsanlage.

Mechanische Systeme sind meistens selbstregulierend und benötigen keinen Sensor. Für stabile Schäume, wie sie in der Antibioticafermentation vorliegen, sind sie wirkungslos und haben sich bis heute nicht durchsetzen können.
Trotz verschiedener Nachteile, welche die Schaumbekämpfung mit oberflächenaktiven Substanzen mit sich bringt, wird diese Methode allgemein angewendet. Ungünstig wirken sich folgende Effekte aus:

- Reduzierung der Oberflächenspannung (vgl. IV.2.2.3.),
- eventuelle Nichtverträglichkeit für die Organismen,
- abbaubare AS-Mittel (org. Öle) können den Stoffwechsel beeinträchtigen,
- AS-Mittel treten in der Weiterverarbeitung auf.

Das Funktionsprinzip beruht auf einer Leitfähigkeitsmessung. Als Leitfähigkeits-Grenzschalter dient ein handelsübliches Niveaukontrollgerät der Firma Endress + Hauser, Maulburg, Deutschland. Die Sonde (vgl. Abb. 35) wird in einen Normstutzen am Fermenterdeckel eingebaut. Bei Berührung der Sondenspitze durch den Schaum, wird ein Wechselstromkreis über die Flüssigkeit zur metallischen Behälterwand (oder im Glasfermenter zu einer Gegenelektrode) geschlossen. Dieser Vorgang bewirkt über die elektronische Verstärkereinheit das Schalten eines Relais.
Im Meßkreis fließt ein Wechselstrom, um eine elektrolytische Zersetzung zu verhindern. Der Meßbereich ist über ein Potentiometer stufenlos von 0...40 kOhm verstellbar.
Die Regelstrecke ist zeitlich verzögert, bedingt durch die Misch- und Reaktionszeit. Zur Anpassung des Grenzwertreglers an dieses Übergangsverhalten und um den AS-Verbrauch gering zu halten, wird der Reglerausgang über einen Doppeltimer getaktet. Die Impulsdauer ist kontinuierlich zwischen 0 bis 3 sec., die der Pause zwischen 0 bis 30 sec. einstellbar.
Ein Zähler registriert die Anzahl der Korrekturimpulse und gestattet somit eine grobe Erfassung des AS-Verbrauchs.
Als Stellglieder eignen sich Einspritz- und Dosierventile, Schlauchquetsch- und Membranpumpen.

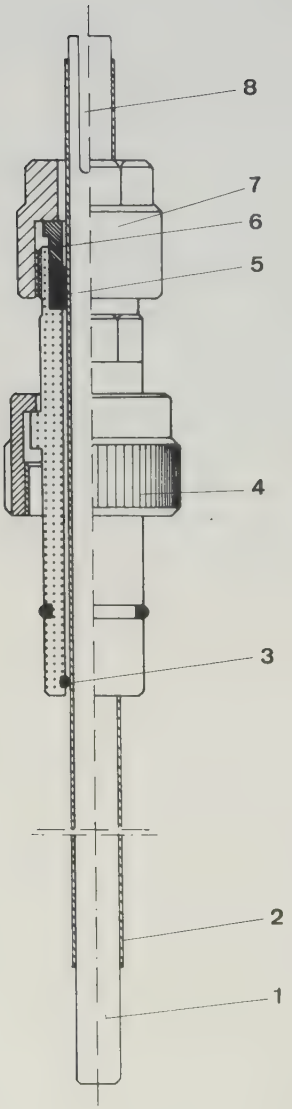


Abb. 35:

Eine in der Höhe verstellbare Sonde zur Feststellung von Schaumbildung. Diese Sonde ist eine Eigenentwicklung.
1, elektrisch leitende Sondenspitze; 2, Teflon-Mantel (Isolation); 3, O-Ring zur Abdichtung der Sondendurchführung; 4, Überwurfmutter zur Befestigung am Normstutzen; 5, Klemmring aus Gummi; 6, Anpreßring; 7, Überwurfmutter zur Fixierung der Sonde; 8, Bohrung für elektrischen Anschluß (Bananenstecker).

8.4. Flüssigkeitsvolumen

Die Regelung des Flüssigkeitsvolumens ist eine Bedingung zur Erreichung des Steady-states bei kontinuierlichen Fermentationen. Sowohl beim Fed-Batch wie beim Chemostaten sind im Quasi-steady-state bzw. im Steady-state die spezifische Wachstumsrate und die Durchflußrate identisch (vgl. IV.3.3.). Die Durchflußrate ist daher die einzige frei wählbare Steuergröße und beruht darauf, daß sich das Steady-state in Abhängigkeit von einem limitierenden Wachstumsfaktor und damit von der Durchflußrate einstellt. Die Durchflußrate D ergibt sich aus dem Zufluß unverbrauchter Nährlösung und dem arbeitenden Flüssigkeitsvolumen:

$$D = \frac{F}{V} = \frac{\text{Zufluß (l/h)}}{\text{Volumen (l)}}$$

Ein quasi-stationärer bzw. stationärer Zustand erfordert daher eine Regelung sowohl des Zuflusses F wie des Volumens V.

Während beim Repeated-Fed-Batch nach jedem Zyklus das Volumen neu auf einen definierten Wert eingestellt werden muß, wird dieses im Chemostaten durch Synchronisation von Zu- und Abfluß kontinuierlich geregelt. Der apparative Aufbau für eine gleichmäßige Nährlösungszugabe (F) ist unter III.8.2.2. beschrieben.
Faktoren, die entweder direkt auf die Organismenentwicklung einwirken oder Instabilitäten des Steady-states zur Folge haben, sind in der Arbeit von FIECHTER (41) ausführlich beschrieben. So müssen einerseits alle Betriebsparameter (wie z.B. Temperatur, pH, Sauerstoffversorgung und Rührung) konstant gehalten werden. Andererseits sollten Fehler von Faktoren, die das Kulturvolumen oder dessen Konzentration direkt beeinflussen, möglichst klein gehalten werden. Bei den üblichen Bruttemperaturen kann die Konzentrierung der Kulturflüssigkeit als Folge der Wasserverdunstung störende Ausmaße annehmen. Durch vorgängiges Sättigen der Belüftungsluft oder Kondensation des Wasserdampfes in der Abluft un-

ter Rückgabe des Kondensates (Rückflußkühler), können Wasserverluste weitgehend unterdrückt werden. Eine Beeinflussung des stationären Zustandes tritt auch durch den erforderlichen Zusatz von Korrekturlösungen (pH-Regelung, Antischaummittel) auf. Diese Zusätze führen besonders bei geringen Durchflußraten zu Fehlern. Eine Kontrolle der Schaumbildung muß das Überschäumen verhindern und den Emulgierungsgrad der Zellsuspension konstant halten. Bei kontinuierlichen Ansätzen ist deshalb eine gleichmäßige Zugabe von Antischaummittel geeigneter, als das zeitliche unregelmäßige Einspritzen in Abhängigkeit von der Höhe der Schaumkrone, wie dies beim automatischen Regelkreis (vgl. III.8.3.) der Fall ist.

Kontinuierliche Kulturen setzen voraus, daß im Reaktor eine konstante Masse homogen gemischter Flüssig- und Partikelphase aufrecht erhalten wird. Daher ist es notwendig, daß der Flüssigkeitsstrom, der den Fermenter verläßt, in seiner Zusammensetzung mit dem Kesselinhalt identisch ist.

Zur Regelung des Flüssigkeitsvolumens existieren verschiedene Systeme. Das einfachste besteht aus einem Überlaufrohr und ist in der Arbeit von FIECHTER (41) beschrieben. Diese Art der Niveaukontrolle ist sehr einfach und betriebssicher, eignet sich aber nur für einzellige Organismen. Bei mycelbildenden Organismen entsteht am Überlaufrohr eine Entmischung (Dekantierung) von Mycel und Nährlösung, was zur Folge hat, daß die Biomasse im Fermenter ansteigt und sich daher kein Steady-state einstellen kann. Verbesserte Überlaufsysteme sind von BRUNNER et al. (22), REUSSER (92) und RIGHELATO et al. (94) beschrieben worden. Um ein Entmischen, wie es an Überlaufsystemen auftritt, zu umgehen, sollte der Auslauf aus einer homogenen Zone erfolgen. Dies erfordert ein Volumen-Kontrollsystem, dessen Meßsignal über einen Regler zur Steuerung eines Stellgliedes am Auslauf benützt werden kann. Die Kontrollvorrichtung, die von BORZANI et al. (17) entwickelt wurde, eignet sich nicht für mycelbildende Organismen, da ihr Niveaufühler durch das Bewachsen mit Organismen funktionsunfähig wird.

BROWN et al. (21) schlagen daher vor, das Volumen über dessen Masse, die mittels einer Membran in der Bodenplatte manometrisch bestimmt wird, zu regeln. Der Nachteil dieses Systems liegt in der Empfindlichkeit auf Druckschwankungen

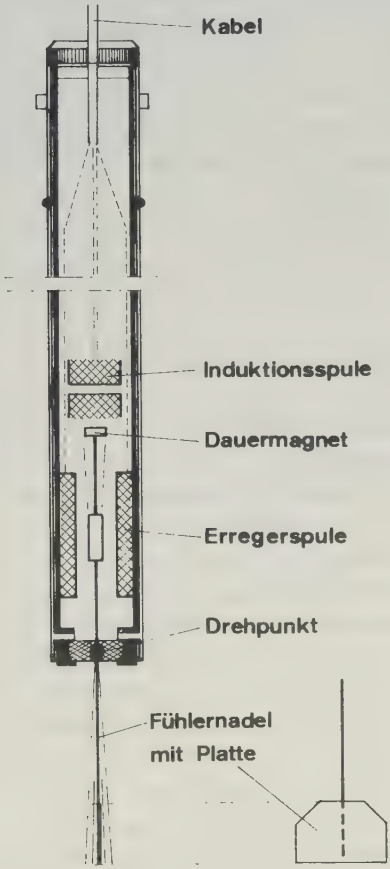


Abb. 36: Sonde zur Niveau-Kontrolle (Modifiziertes Niveausteuergerät der Bircher AG, Beringen-Schaffhausen/Schweiz).

im Fermenterinnenraum. Es ist daher naheliegend, den gesamten Reaktionskessel auf eine Wägeeinrichtung (z.B. Druckmeßdosen) zu montieren und so die Kulturmasse zu bestimmen. Diese Methode ist nur bei einem günstigen Verhältnis von Eigengewicht zu Nutzgewicht des Fermenters erfolgversprechend. Dies trifft für den in dieser Arbeit beschriebenen Fermenter nicht zu. Es wurde daher am Institut ein Niveaufühler entwickelt, wie er in Abb. 36 dargestellt ist.
Dazu wurde ein kommerzielles Niveausteuergerät Typ "binivo" der Bircher AG, Beringen-Schaffhausen/Schweiz, so modifiziert, daß die Sonde, d.h. der Sondenschaft (in 19 mm Normstutzen) mit eingebauter Fühlernadel, in situ sterilisiert werden kann, während die übrigen Teile der Sonde erst nach Abkühlen des Fermenters eingebaut werden. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wurde einerseits die Nadel mit einer breiten Fühlerplatte versehen, andererseits wurde auf elektronischem Wege die Ansprechempfindlichkeit des Steuergerätes verbessert.
Die Fühlernadel wird vom Steuergerät elektrisch in mechanische und, dank der besonderen Konstruktionsart, verschleißlose Schwingungen versetzt. Als Drehpunkt dient ein aufvulkanisiertes Gummilager, womit mechanisch bewegte Teile vermieden und gleichzeitig Dichtungsprobleme gelöst werden.
Die Schwingung der Fühlernadel, die am Ende in der Sonde einen kleinen Magneten trägt, erzeugt in der Induktionsspule eine Induktionsspannung, die über ein abgeschirmtes Kabel dem Steuergerät zugeleitet wird und dadurch das Ausgangsrelais schaltet (Prinzip eines Grenzwertschalters). Sobald die Fühlernadel beim Eintauchen in die Kulturflüssigkeit an der Weiterführung der Schwingung durch eine Dämpfung in dieser Flüssigkeit gehindert wird, fällt die Induktionsspannung ab, was ein Schalten des Relais zur Folge hat. Umgekehrt verläuft der Schaltvorgang, sobald bei sinkendem Niveau die Fühlerplatte freigelegt wird, und die Nadel die Schwingung wieder aufnehmen kann. Dieser Schaltvorgang kann zur Steuerung des Stellgliedes - in diesem Falle einer Schlauchpumpe - am Fermenter-Auslaß herangezogen werden.

Die Vibration der Fühlernadel verhindert ein Festwachsen der Organismen, so daß sich dieses System für Langzeitversuche eignet. Erste Versuche zeigten eine Regelgenauigkeit, die zwischen 0.5 % und 1 % des Gesamtvolumens liegt. Die Sonde tastet das Niveau unterhalb des Überwurfs des Leitstrahls, d.h. in einer relativ ruhigen Zone, ab (vgl. Abb. 37).

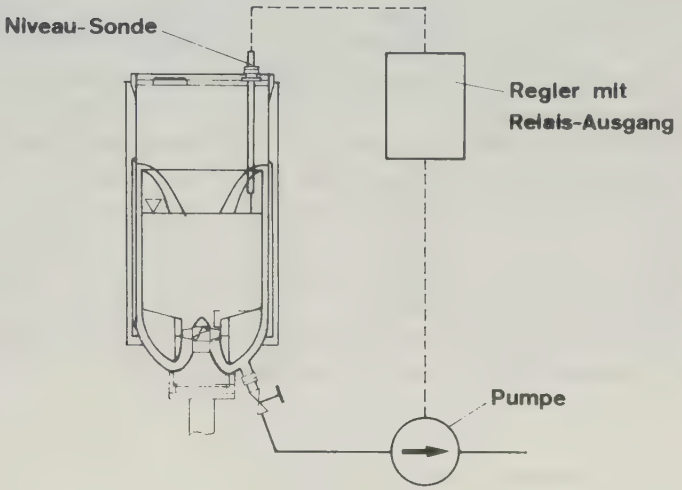


Abb. 37: Regelkreis für Flüssigkeitsvolumen bei kontinuierlichen Systemen.

9. Überwachung chemischer Parameter

9.1. Elektrochemische Sensoren

Elektroden sind Einrichtungen, mit denen man Ladungsverschiebungen und Ladungstrennungen, die an Phasengrenzflächen entstehen, feststellen oder aber mittels einer Polarisationsspannung erzeugen und verändern kann. Bei jeder elektrochemischen Messung ist man gezwungen, die Meßelektrode mit einer zweiten, anders gearteten Elektrode, mit einer Bezugs- oder Referenzelektrode, zu komplettieren.
Im Gegensatz zu anderen analytischen Verfahren zeigen Elektroden in erster Linie nicht die Konzentration, sondern die Aktivität der für die betreffende Elektrode charakteristischen Spezie an. Dieses Verhalten ist durchaus kein Nachteil, denn die Aktivität ist die wichtigere Meßgröße, da alle chemischen und biologischen Reaktionen durch die Aktivitäten (Wirkkonzentrationen) der anwesenden Substanzen gesteuert werden. Für die Umrechnung der Aktivität auf die Konzentration benötigt man weitere Informationen (Ionenstärke) über die Meßlösung.
Die gebräuchlichen Elektroden können unterteilt werden in potentiometrische und amperometrische.

9.1.1. Potentiometrische Elektroden

Die potentiometrischen Elektroden umfassen die Standard-Kalomel- und die Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode, pH-Glaselektroden, Redox- und ionensensitive Elektroden. Der Ausdruck "potentiometrisch" weist darauf hin, daß es sich um eine elektrochemische Spannungsmessung handelt.

Eine galvanische Kette besteht aus zwei metallischen Leitern, welche durch eine oder mehrere Elektrolytlösungen elektrisch verbunden sind. In der Potentiometrie bestimmt man die Kettenspannung U zwischen den beiden metallischen Leitern (Elektroden), die über ein Meßinstrument, das einen möglichst großen Innenwiderstand ($>10^{12}$ Ohm) aufweist, miteinander verbunden sind. Durch die "stromlose" Messung

($< 10^{-12}$ Amp.) wird die chemische Zusammensetzung des Meßgutes nicht verändert.
Bei der galvanischen Kette findet an den Phasengrenzflächen ein Ladungsaustausch statt, welcher für die Entstehung der einzelnen Galvanispannungen verantwortlich ist. Da mindestens zwei Phasengrenzen vorhanden sind, können Galvanispannungen nicht einzeln bestimmt werden. Die meßbare Kettenspannung U setzt sich daher immer aus mehreren Komponenten zusammen.

Metall A / Elektrolyt 1 // Elektrolyt 2 / Metall B

E_1 E_2 E_3

$U = E_1 + E_2 + E_3$

E_1, E_3 : Galvanispannungen

E_2 : Diffusionsspannung

Um aus der meßbaren Kettenspannung U die Galvanispannung der Meßelektrode berechnen zu können, müssen die anderen Komponenten von U konstant sein. Dies ist die wichtigste Voraussetzung für eine genaue potentiometrische Messung.

Meßelektrode : E_1 ist abhängig von der Aktivität des zu messenden Ions

Bezugselektrode : Die Bezugselektrodenspannung E_3 und die Diffusionsspannung E_2 müssen konstant sein.

Wenn nur von einer Elektrodenspannung die Rede ist, so ist dieser Ausdruck als Kürzel für Elektrodenspannungsdifferenz aufzufassen.
Bleiben E_2 und E_3 konstant, so ist U linear abhängig von E_1, d.h. proportional dem Logarithmus der zu messenden Ionenaktivität. Dies zeigt theoretisch die von NERNST aufgestellte Gleichung:

$$E = E_o \pm \frac{R\,T}{n\,F}\ 2.30 \log a_x$$

E	Potentialdifferenz zwischen Meß- und Bezugselektrode in mV (Gesamtpotential der Meßkette)
E_o	Nullpotential der Meßkette bei Standardbedingungen
R	Gaskonstante 8.31439 Joule/Grad Mol
T	abs. Temperatur in ^{o}Kelvin
n	Wertigkeit der Ladung des zu bestimmenden Ions
F	Faraday-Konstante 96493.1 Coulomb/Val
a_x	Aktivität des zu messenden Ions

Der Faktor 2.3 $\frac{RT}{nF}$ wird als Nernstspannung U_N bezeichnet und ist identisch mit der Spannungsänderung bei einer zehnfachen Änderung der Aktivität. Der Nernstfaktor ist temperaturabhängig und beträgt bei 20^{o} C für einwertige Ionen 58.16 mV, für zweiwertige 29.1 mV. Das Vorzeichen vor dem Nernstfaktor ist positiv für Kationen und negativ für Anionen.

In den letzten Jahren hat die Potentiometrie einen bemerkenswerten Aufschwung erlebt. Enorme Entwicklungen wurden auf den Gebieten von pH-Messungen unter extremen Bedingungen und vor allem von neuartigen ionenselektiven Elektroden und deren Anwendung in der Analytik geleistet.

Neben diesen Erfolgen der Meßelektroden führt die Bezugselektrode ein eher bescheidenes Dasein. Dabei ist die Genauigkeit einer potentiometrischen Messung oft durch die Bezugselektrode gegeben. Die Erfahrung hat ferner gezeigt (24,30), daß die Mehrzahl der meßtechnischen Probleme direkt mit der Bezugselektrode zusammenhängen.

Eine ideale Bezugselektrode sollte folgenden Anforderungen genügen:

- eine stabile Spannung aufweisen
- nicht polarisierbar sein
- reversible Spannungsänderung bei starker Belastung zeigen
- Spannung soll nur durch die Nernstgleichung bestimmt sein

- keine Temperaturhysterese und einen
- geringen Temperaturkoeffizienten aufweisen (24)

Nicht nur das Ableitsystem, sondern auch alle anderen Elemente der Bezugselektrode sind dem jeweiligen Meßproblem anzupassen. Störungen des Bezugselektroden-Systems sind in der Mehrzahl der Fälle auf einen Erdschluß zurückzuführen (24). Nach DIN 19 265 (1967) muß die Bezugselektrode gegen Erde einen Isolationswiderstand von mindestens 10^7 Ohm haben. Die modernen Meßverstärker erfüllen diese Anforderung, nicht aber die meisten Sekundärinstrumente, wie Schreiber, Regler, Drucker etc. Um Erdschlüsse zu vermeiden, darf der Meßstromkreis nur an einer einzigen Stelle geerdet sein. Bei industriellen Anlagen kann eine Verbindung der Meßlösung mit der Erde meist nicht vermieden werden, da geerdete Metallteile mit ihr in Berührung stehen. Im Falle eines Erdschlusses kann das Metallteil die Rolle der Bezugselektrode übernehmen. Da hier aber die Galvanispannung von der schwankenden Zusammensetzung der Meßlösung abhängt, wird es unmöglich, den Anteil der Meßelektrode an der gesamten Kettenspannung zu bestimmen. Dies führt zu falschen und schwankenden Meßwerten. Ein möglicherweise durch den Erdschluß fließenden Gleichstrom kann über einen längeren Zeitabschnitt zur vollständigen Reduktion des Bezugselektroden-Systems führen.
Der Bezugselektrolyt ist verantwortlich für eine konstante Spannung des Bezugselektroden-Systems, das bei Ag/AgCl- und Kalomelektroden durch die Chloridionenaktivität bestimmt wird.

$$E_{\text{Bezugselektrode}} = E_o - U_N \log a_{Cl^-}$$

An den Bezugselektrolyten werden folgende Anforderungen gestellt:

- konstante Chloridionenaktivität
- kleiner elektrischer Widerstand
- chemisch inert und neutral

- keine Reaktion mit der Meßlösung
- äquitransferent (gleiche Beweglichkeit von Kation und Anion)

Eine konzentrierte Kaliumchloridlösung erfüllt diese Bedingungen weitgehend.
Das Diaphragma sorgt für den elektrolytischen Kontakt zwischen der Bezugselektrode und der Meßlösung und muß folgenden Anforderungen genügen:

- es soll chemisch inert sein
- es soll einen kleinen Durchfluß von Elektrolyt bei kleinem elektrischen Widerstand gewährleisten
- es soll keine Ionenaustauscher-Eigenschaften aufweisen.

Ein feinporiges Keramikdiaphragma erfüllt diese Bedingungen weitgehend.
Bei speziellen Meßproblemen haben sich andere Diaphragmaarten und -formen durchsetzen können (24,30,95,100).
Jede chemische Reaktion zwischen Bestandteilen des Elektrolyten und der Meßlösung ist zu verhindern. Schwerlösliche Ausfällungen können den elektrischen Widerstand des Diaphragmas stark erhöhen und zu schwankenden Meßwerten führen. Mit den folgenden Ionen ist die Bildung von schwerlöslichen Verbindungen mit KCl zu erwarten (24):

$$Hg_2^{2+},\ Cu^{+},\ Ag^{+},\ Pb^{2+},\ ClO_4^{-}$$

Schwerwiegender ist die Bildung von unlöslichen Silberverbindungen bei Ag/AgCl-Bezugselektroden. In einer 1M KCl-Lösung sind ca. 14 mg AgCl/l und in einer gesättigten KCl-Lösung sogar 1 g AgCl/l löslich (24). Die steigende Löslichkeit von Silberchlorid mit steigender Kaliumchloridkonzentration ist auf die Bildung von Chlorokomplexen $AgCl_3^{2-}$ und $AgCl_4^{3-}$ zurückzuführen.
Silberchlorid reagiert mit Bromid, Jodid, Cyanid und vor allem Sulfid. Die Mehrzahl der biologischen Flüssigkeiten enthält schwefelhaltige Verbindungen wie z.B. Cystin und

Cystein. Sehr häufig trifft man bei Elektroden, welche in solchen Flüssigkeiten, insbesondere Fermentationsmedien, eingesetzt worden sind, schwarze silbersulfidhaltige Diaphragmen.
In diesen Fällen muß die Bezugselektrode von der Meßlösung durch einen Hilfs- oder Brückenelektrolyt getrennt werden, welcher mit den erwähnten Ionen keine Reaktion eingeht (vgl. Abb. 40)
Um das Eindringen von Meßgut durch das Diaphragma zu verhindern, müssen Bezugselektroden gegenüber der Meßlösung immer unter einem kleinen Überdruck stehen. Messungen ergaben (24), daß die Eindiffusion von Meßgut bereits bei einem Überdruck von 10 cm Wassersäule so gut wie Null ist. Bei einer korrekten Anordnung fließt daher immer eine kleine aber definierte Menge Elektrolyt durch das Diaphragma in die Meßlösung.
Bei ionensensitiven Meßketten muß der Bezugselektroden-Elektrolyt in seiner Zusammensetzung so gewählt sein, daß durch seine Diffusion in die Meßlösung deren Konzentration und damit das Meßergebnis nicht verfälscht werden.

9.1.2. Amperometrische Elektroden

Eine weitere Gruppe von Elektroden wird amperometrisch genannt, da der Strom - und nicht die Potentialdifferenz - der aktivitäts- bzw. konzentrationsbezogene Parameter ist. Dabei wird die zu analysierende Spezie reduziert bzw. oxidiert. Durch diesen chemischen Umsatz an der Elektrode wird das chemische Gleichgewicht gestört. Im Gegensatz zur Potentiometrie sind daher bei der Amperometrie die Elektrodengeometrie, Strömungsgeschwindigkeit und Viskosität von entscheidender Bedeutung. Der Reaktionsablauf bei diesem Elektrodentyp erfordert eine bestimmte Potentialdifferenz zwischen Anode und Kathode. Wird diese Differenz von einer äußeren Spannungsquelle erzeugt, spricht man von einer amperometrischen (polarographischen) Meßkette. Bilden Anode

und Kathode mit dem Elektrolyten zusammen eine galvanische Zelle, nennt man diese Meßkette amperometrisch mit Hybridzelle (galvanisch).

9.1.3. Enzym-Elektroden

Elektrochemische Sensoren haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Sie haben sich besonders dort als wertvoll erwiesen, wo es darauf ankam, einfache und schnelle Meßmethoden zur Verfügung zu haben.
Eine relativ neue Gruppe elektrochemischer Sensoren sind Elektrodensysteme, in denen eine Enzymreaktion als Hilfsmittel zur Erzeugung einer hohen Selektivität verwendet wird. Derartige Elektrodensysteme werden als Enzymelektroden oder auch als elektrochemisch-enzymatische Sensoren bezeichnet (70).
Abhängig von der Art der Enzymreaktion, der zu messenden Spezie oder des Typs des elektrochemischen Sensors, ist eine Vielfalt von Sensoren denkbar. Vom Standpunkt aus gesehen, was gemessen wird, können drei verschiedene Parameter aufgeführt werden: a) ein Reaktionsprodukt (z.B. H^+ mit einer pH-Elektrode oder H_2O_2 mit einer Platin-Elektrode); b) der Verbrauch eines Coenzyms (z.B. O_2 mit einer O_2-Elektrode); und c) die Umwandlung (Redox) eines künstlichen Coenzyms (z.B. Hydrochinon, I_2 oder Hexacyanoferrat) mit einer Pt-Elektrode mittels einer elektrochemischen Reaktion.
Bei Messungen von pH-Änderungen (Typ a) ist das Meßprinzip potentiometrisch (vgl. III.9.1.1.). Als Beispiel kann die von ENFORS et al. (39) entwickelte Elektrode zur Bestimmung der Penicillinkonzentration aufgeführt werden. Die meisten der heute bekannten Sensoren, sie sind in der Arbeit von SATOH et al. (97) aufgeführt, basieren auf einer amperometrischen Messung der Reaktionsprodukte.
Es sind eine Reihe von Enzymen aus der Gruppe der Oxydoreductasen bekannt, die organische Redoxraktionen gemäß dem Schema:

$$S + A \xrightleftharpoons{\text{Enzym}} P + A^{n-} + nH^+$$

katalysieren. Mit der Oxydation des Substrates (S) zu dem Produkt (P) ist stets ein gegenläufiger Redoxprozeß gekoppelt, nämlich die Reduktion eines Elektronen- oder Wasserstoffakzeptors (A). Das Prinzip dieser Sensoren besteht darin, die reduzierte Form des Akzeptors elektrolytisch zu oxidieren und den dafür benötigten Strom in Relation zur Substratkonzentration zu setzen.
Als Beispiel soll hier die Glucose-Elektrode der F. Hoffmann-LaRoche & Co., Ltd., Bioelectronics Departement, Basel/Schweiz, dienen.
Die Enzymreaktion verläuft nach der Michaelis-Menten-Kinetik. Das Substrat (Glucose) lagert sich zunächst an die oxidierte Form des Enzyms E_{ox} an, wobei ein Substrat-Enzymkomplex gebildet wird, der in das Reaktionsprodukt und die reduzierte Form des Enzyms, E_{red}, zerfällt:

$$S + E_{ox} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} SE \xrightarrow{k_2} P + E_{red}$$

Als Enzym wird Glucoseoxidase verwendet. Das Reaktionsprodukt ist Gluconsäure. Für das Enzym ist Hexacyanoferrat-(III) ein Elektronenakzeptor, der das Enzym in die oxidierte Form zurückzuführen vermag. Das dabei entstandene Hexacyanoferrat-(II) wird an einer Platinelektrode oxidiert:

$$E_{red} + 2 \left[Fe(CN)_6\right]^{3-} \xrightarrow{k_3} E_{ox} + 2 \left[Fe(CN)_6\right]^{4-} + 2H^+$$

$$2 \left[Fe(CN)_6\right]^{4-} \xrightarrow{(Pt)} 2 \left[Fe(CN)_6\right]^{3-} + 2e^-$$

Die Platinelektrode befindet sich in Kontakt mit einer ca. 0.1 mm dünnen Schicht des gelösten Enzyms und ist mit einer

semipermeablen Membran überspannt. Die Membran ist durchlässig für niedermolekulare Stoffe, wie für Substrat, Produkt und Akzeptor, jedoch undurchlässig für das Enzym. Die Platinelektrode wird auf ein zur quantitativen Oxidation des Hexacyanoferrat-(II) ausreichend positives Potential gegen eine Ag/AgCl-Elektrode gebracht und der Strom in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gemessen. Einzelheiten über Geräteaufbau und Sensorcharakteristik sind den Arbeiten von MINDT et al. (70) und MOR et al. (73) zu entnehmen. Enzymelektroden sind primär für den klinischen Bereich entwickelt worden, wo schnelle und einfache Meßmethoden gebraucht werden. Die Anwendung in der Mikrobiologie ist ebenfalls dafür gedacht, wenn es gilt, schnelle Entscheidungen über den Prozeßverlauf zu treffen. Ein großer Vorteil dieser Sensoren gegenüber herkömmlichen Systemen liegt darin, daß die Proben nicht optisch klar sein müssen. Es können daher auch stark gefärbte Proben aus komplexen Medien gemessen werden. Die Analysenkosten reduzieren sich erheblich, da nur ein Verbrauch an Pufferlösung entsteht. Dies steht in krassem Gegensatz zu den üblichen Analyzer-Systemen, bei denen die Reagentien mit der Probe verworfen werden und für die nächste neue eingesetzt werden. Aus diesem Grunde werden diese Sensoren auch für Routinebestimmungen interessant.

9.2. pH

9.2.1. pH-Elektrode

Eine sterilisierbare pH-Elektrode muß hohen Temperaturen, Drücken und mechanischen Beanspruchungen standhalten. Elektroden mit einer zylinderischen Membran haben sich am besten bewährt. Die thermischen Ausdehnungskoeffizienten von Membran- und Schaftglas müssen sehr ähnlich sein, um Spannungsrisse bei großen Temperaturänderungen zu vermeiden.

In den letzten Jahren hat die Glaselektrode die anderen Verfahren zur pH-Messung weitgehend verdrängt. Das pH-sensitive Glas reagiert ganz allgemein mit Wasser oder mit Wasserdampf. Dies führt zu einer sogenannten Quellschicht auf beiden Seiten der pH-aktiven Membran. Die wasserhaltige Quellschicht weist eine andere chemische Zusammensetzung und Struktur auf als die Glasmasse. Innerhalb dieser Quell- oder Gelschicht entsteht die Spannung, die abhängig ist von der Wasserstoffionenaktivität der umgebenden wässrigen Lösung.

Die Glaselektrode spricht nicht im ganzen pH-Bereich spezifisch auf Wasserstoffionen an. Die Kieselgelschicht kann außer H_3O^+-Ionen z.B. auch Alkaliionen aufnehmen. So kann man den Alkalifehler der Glaselektroden erklären (95). Der Austausch von Wasserstoff- gegen Alkaliionen erfolgt bevorzugt im alkalischen Bereich. Hohe Alkaliionenkonzentration in der Lösung erhöht die Alkaliionenkonzentration in der Quellschicht. Entsprechend der Nernst'schen Theorie werden dann neben den Wasserstoffionen auch die Alkaliionen elektromotorisch wirksam, d.h. das gemessene Potential ist abhängig von der Konzentration beider Ionenarten. Das resultierende Mischpotential täuscht bei der praktischen pH-Messung zu niedrige pH-Werte vor. Glaselektroden zeigen ebenfalls in stark sauren Lösungen Abweichungen von der idealen H-Funktion. Die Quellschicht nimmt Säuremolekeln auf, wodurch die Wasserstoffionenaktivität erhöht wird, was zu positive pH-Werte ergibt. Der Säurefehler spielt eine weniger wichtige Rolle als der Alkalifehler und macht sich erst bei sehr kleinen pH-Werten bemerkbar. Glaselektroden mit einem kleinen Alkalifehler weisen auch einen kleinen Säurefehler auf.

Säure- und Alkalifehler, sowie der Zusammenhang zwischen Spannung und pH-Wert einer Glaselektrode bei verschiedenen Temperaturen sind in Abb. 38 dargestellt.

Die Spannung an der Innenseite der Membran wird durch den pH-Wert des Innenpuffers konstant gehalten. Die äußere Membranspannung ist von der Meßlösung abhängig. Man nimmt

heute allgemein an, daß die Spannung in der äußersten Quellschicht ihren Ursprung hat. Demgegenüber wird der elektrische Widerstand von Glasmembranen vorwiegend durch den Übergang Quellschicht/Glasmasse bestimmt. Der Nullpunkt einer Meßkette ist identisch mit dem pH-Wert, bei welchem die Kettenspannung Null ist. Moderne pH-Meter verlangen vorwiegend einen Elektroden-Nullpunkt bei pH 7.
Alle wichtigen Parameter einer Glaselektrode wie Steilheit, Ansprechzeit, elektrischer Widerstand von Glasmembranen werden vor allem durch Struktur und Dicke der Quellschicht beeinflußt. Diese wiederum ist temperaturabhängig. Die wichtigste Voraussetzung für eine sterilisierbare Elektrode ist demnach: Reversible Änderung der Elektroden-Charakteristik mit der Temperatur. Solche idealen pH-Elektroden existieren nicht. Jede Sterilisation fördert den Alterungsprozeß von Elektroden. Dies manifestiert sich in einer abnehmenden Steilheit, einer größeren Ansprechzeit und einem erhöhten

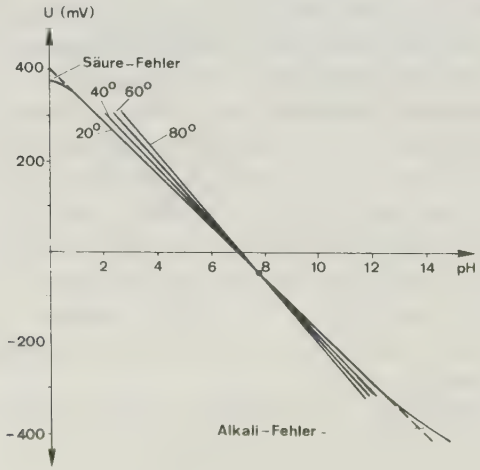


Abb. 38: Abhängigkeit der Spannung einer Glaselektrode vom pH-Wert für verschiedene Temperaturen.

Membranwiderstand. Es wurden daher spezielle pH-Gläser entwickelt, die ein möglichst reversibles Verhalten zeigen bzw. nur langsam altern (vgl. Abb. 39).
Die graphische Darstellung der Meßkettenspannung als Funktion des pH-Wertes ergibt eine Gerade, deren Neigung von der Temperatur abhängig ist. Die verschiedenen Temperaturen angehörenden Geraden, die sogenannten Isothermen, schneiden sich in einem Punkt, dem Isothermenschnittpunkt.
Die Bedeutung dieses Punktes ist für eine genaue pH-Messung bei schwankender Meßgut-Temperatur sehr groß und nach DIN 19 265 sind deshalb Korrekturmöglichkeiten für pH-Meßverstärker vorgeschrieben.

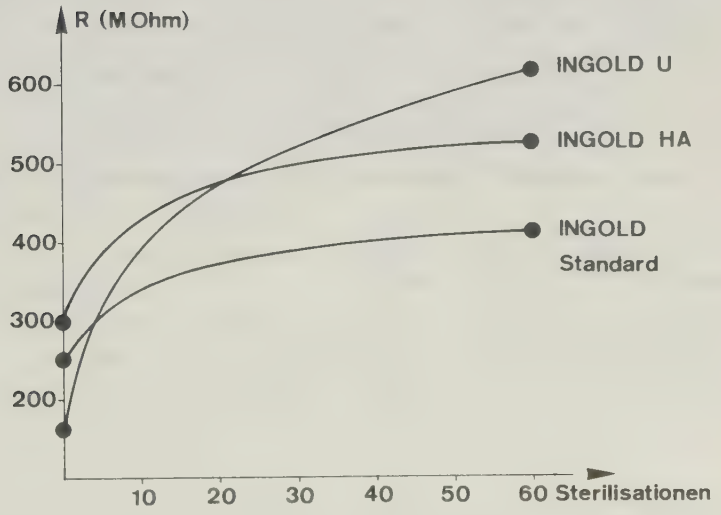


Abb. 39: Alterung verschiedener pH-Membrangläser in Abhängigkeit von der Zahl der Sterilisationszyklen.

Zur Temperaturkompensation bei pH-Messungen sind häufig Unsicherheit und falsche Vorstellungen festzustellen. Die wesentliche Unterscheidung bei der Beurteilung des Temperatureinflusses auf die pH-Messung ist folgende:

- Die Elektrodenfunktion der pH-Sonden ist temperaturabhängig und wird durch die Temperaturkorrektureinstellung am pH-Verstärker kompensiert.
- Der pH-Wert des Meßgutes ist ebenfalls temperaturabhängig, es kann aber keine Temperaturreduktion auf eine Standardtemperatur erfolgen, weil der Temperaturgang verschiedener Lösungen ganz unterschiedlich verläuft. Es gehört also zu jedem pH-Meßwert eine Temperaturangabe.

Tabelle 2: Ansprechzeit und Steilheit der Elektroden aus Abb. 39

	Ansprechzeit (99.5%) (Puffer pH 4 - pH 7, 25° C)		Steilheit	
	Anzahl Sterilisationen		Anzahl Sterilisationen	
	0	30	0	30
INGOLD HA	4 sec	12 sec	174 mV	174 mV
INGOLD Standard	10 sec	12 sec	174 mV	174 mV
INGOLD U	7 sec	17 sec	173 mV	174 mV

Das Altern einer Glaselektrode ist wahrscheinlich auf eine Strukturänderung der Quellschicht zurückzuführen. Durch Abätzen mit Flußsäure kann die äußere Quellschicht entfernt werden, was oft zu einer Verbesserung der Elektrodeneigenschaften führt.

In der Fermentationsindustrie haben sich heute die kombinierten Elektroden durchgesetzt, da nur ein Meßgeber - und somit nur ein Einbaustutzen - anstelle von zweien benötigt wird. Die Einstabmeßketten sind ähnlich wie die abgeschirmten Glaselektroden aufgebaut. Der zwischen dem äußeren Schaft und dem inneren Ableitsystem vorhandene koaxiale Abschirmraum enthält das Bezugselektrodensystem und den Bezugselektrolyten. Dieser wirkt gleichzeitig als Abschirmung.

Die Verschmutzung des keramischen Diaphragmas ist die häufigste Ursache für fehlerhafte pH-Messungen bei Fermentationen. Verunreinigte Diaphragmen zeigen oft kein ideales Verhalten, da sie gewisse Ionen bevorzugt zu absorbieren scheinen (Ionenaustauscher-Eigenschaften). Die selektive Bindung von Ladungsträgern führt zwangsläufig zu einer Ladungstrennung am Diaphragma und somit zu einer wesentlich größeren Diffusionsspannung. Bei Fermentationen treten, je nach Substrat, folgende Diaphragmakontaminationen häufig auf:

- Verschmutzung durch Proteine
- Verschmutzung durch Silberverbindungen

Das Verhalten von silbersulfidhaltigen Diaphragmen wurde genau untersucht (24):

- Ag_2S vergrößert die Ansprechzeit von Meßketten außerordentlich.
- Ag_2S führt zu großen und nicht reproduzierbaren Diffusionsspannungen, welche direkt als Fehler in die pH-Messung eingehen. Oft ist eine Eichung der Meßkette nicht mehr möglich. Die Diffusionsspannungen sind abhängig vom pH-Wert und von der Salzkonzentration der Meßlösung.
- Ag_2S erhöht den Diaphragma-Widerstand R_D um ein Vielfaches. Der höchstzulässige Wert von R_D hängt vom verwendeten pH-Meter ab.
- Ein durch Ag_2S kontaminiertes Diaphragma verhält sich näherungsweise wie eine Silber- bzw. Sulfid-Elektrode.

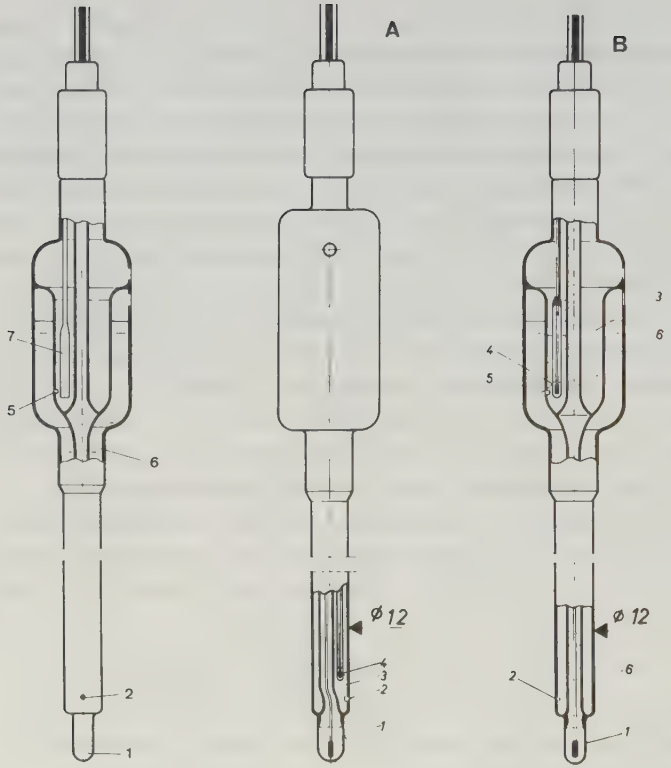


Abb. 40a: Elektrode mit zusätzlicher Brückenelektrolytkammer

40b: Elektroden für die Differential-pH-Messung

1, Glasmembran; 2, äußeres Diaphragma; 3, Bezugselektrodenraum; 4, Bezugs-pH-Elektrode; 5, inneres Diaphragma; 6, Brückenelektrolyt; 7, Bezugselektrode.

Einige Verunreinigungen wie Silbersulfid sind sichtbar, andere wie Proteinablagerungen nicht. Silberverbindungen können mit einer sauren Thioharnstofflösung, Proteine mit einer Proteinase entfernt werden.

Um die Reaktion von Silberionen des Bezugselektrolyten mit Sulfid der Meßlösung zu verhindern, wird ein silberfreier Hilfs- oder Brückenelektrolyt benutzt. Die Abb. 40 a zeigt eine spezielle Elektrode mit zwei Elektrolytkammern. Die innere enthält die Silber/Silberchloridelektrode und die Kaliumchloridlösung, gesättigt mit Silberchlorid. Die äußere wird mit einem silberfreien Brückenelektrolyten (KCl, KNO_3) gefüllt. Da das gelöste Silberchlorid langsam durch das innere Diaphragma in den Brückenelektrolyten diffundiert, muß dieser periodisch ausgewechselt werden.
Die pH-Messung bei der Differenztechnik basiert auf einer Spannungsmessung zwischen zwei identischen pH-Elektroden. Die eine taucht in die Fermentationslösung, die andere in eine Pufferlösung, welche über ein Diaphragma mit der Meßlösung in Kontakt steht. Diese pH-Elektroden können ebenfalls in die Standard-Einbauarmaturen eingebaut werden. Bei dieser Meßanordnung tritt kein silberhaltiger Bezugselektrolyt mit der Meßlösung in Kontakt, wodurch Diaphragmakontaminationen verhindert werden (Vgl. Abb. 40 b).
Bei der Elektrode A kann der Bezugselektrodenraum z.B. mit einer konzentrierten Pufferlösung gefüllt werden, die für eine konstante Spannung der Bezugs-pH-Elektrode sorgt. Der Bezugselektrolyt soll möglichst äquitransferent sein, um die Diaphragmaspannung klein zu halten. Eine Kaliumchloridlösung ist annähernd äquitransferent und wird deshalb häufig verwendet. Pufferlösungen sind selten äquitransferent und daher weniger geeignet. Es empfiehlt sich deshalb, Pufferlösungen zu verwenden, die neben der Puffersubstanz viel Kaliumchlorid enthalten.
Bei der Wahl der Bezugslösung ist darauf zu achten, daß am Diaphragma keine Fällungen entstehen können. Viele Fermentationslösungen enthalten Kalzium, das z.B. mit Phthalat (Pufferlösung pH 4) oder mit Phosphat (Pufferlösung pH 7) schwerlösliche Niederschläge bildet.
Weniger problematisch ist die Elektrode B, bei der die innere Pufferlösung über eine Kaliumchloridlösung mit der Meßlösung in Verbindung steht.

Wegen dem hohen Innenwiderstand der Meßelektrode von bis zu 10^9 Ohm sind besondere Installationsvorschriften zu beachten: Die Verbindungsleitung zwischen der kombinierten Glaselektrode und dem Meßverstärker (das Elektrodenkabel) muß einen Isolationswiderstand von 10^{15} Ohm/m aufweisen. Damit keine Störspannungen auf die Leitung übertragen werden, muß diese abgeschirmt sein (Aufbau als Koaxialkabel). Weil sich beim Bewegen derart hochohmiger Leitungen statische Ladungen aufbauen, sollte eine niederohmige (also gutleitende) Kunststoffolie um die Innenleiterisolation gewickelt sein. Das Elektrodenkabel wird über einen Koaxialstecker mit der Steckbuchse (DIN 19 262) am Verstärker verbunden.
Üblicherweise wird der Fermenter mit eingebauter pH-Elektrode mit Heißdampf sterilisiert. Je nach Fermentergröße und Konstruktion wird nach zwei verschiedenen Methoden sterilisiert. Dies bedingt für die pH-Messung unterschiedliche Geberkonstruktionen und Einbauweisen.
Kleinfermenter werden mit Nährmedium und Einbauteilen im Autoklaven sterilisiert. Dies heißt, daß nicht nur der in das Fermentergefäß hineinragende Elektrodenteil, sondern auch der Elektrodenkopf mit Kabel und Stecker, Wärme und Feuchtigkeit ausgesetzt werden. Es hat sich gezeigt, daß die Dampfdurchlässigkeit des Kabelmantels die Lebensdauer einer pH-Elektrode stark reduziert. Der durch die äußere Kabelhülle eindringende Wasserdampf führte sukzessive einen Kurzschluß zwischen pH- und Bezugselektrode herbei. Da keine dampfundurchlässige Kabelumhüllung existiert, wurde eine kabellose Elektrode von der Firma Dr. W. Ingold AG, Urdorf/Schweiz, entwickelt. Der Kabelstecker kann nach der Sterilisation direkt auf den Elektrodenkopf montiert werden.
Bei der Sterilisation wirkt sich an der Bezugselektrode während der Sterilisation keine Druckdifferenz aus, sodaß auf den Einbau der Elektrode in ein Druckgehäuse verzichtet werden kann.
Bei Fermentern, die in-situ sterilisiert werden, ist die Elektrode während dieser Phase einem Überdruck unterworfen.

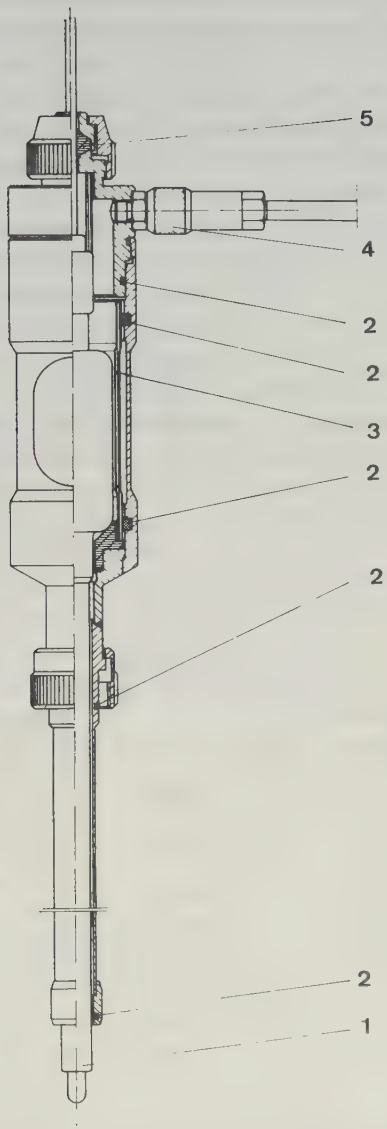


Abb. 41:

Sterilisierbare pH-Elektrode in druckdichtem Gehäuse. 1, Glaselektrode; 2, O-Ringe; 3, Glaszylinder; 4, Schnellkupplungsanschluß für Drucküberlagerung; 5, druckdichte Koaxialkabeldurchführung.

Die Stabilität des Bezugselektrodenpotentials ist nur gewährleistet bei einer konstanten Chloridionenkonzentration im Elektrolyten.
Jegliche Verdunstung, Verdampfung und Verschmutzung ist zu verhindern. Aus diesem Grunde darf der Druck in der Bezugselektrode nie kleiner sein als im Reaktionskessel. Geeignet ist eine Überkompensation von 0.1 - 0.2 bar, d.h. ca. 1.3 bar während der Sterilisation bei 121° C und 0.2 bar während der Fermentation. Der kleine Überdruck in der Referenzelektrode verhindert die Eindiffusion von Meßgut durch das Diaphragma in die Bezugselektrode. Zur Drucküberlagerung der pH-Elektrode wird diese in ein druckdichtes, rostfreies Gehäuse eingesetzt (vgl. Abb. 41). Die Druckaufgabe erfolgt über eine permanente äußere Druckquelle, die mittels Schnellkupplung mit dem Druckgehäuse verbunden wird. Bei konstantem Arbeitsdruck kann die Drucküberlagerung durch ein Hand-Druck-

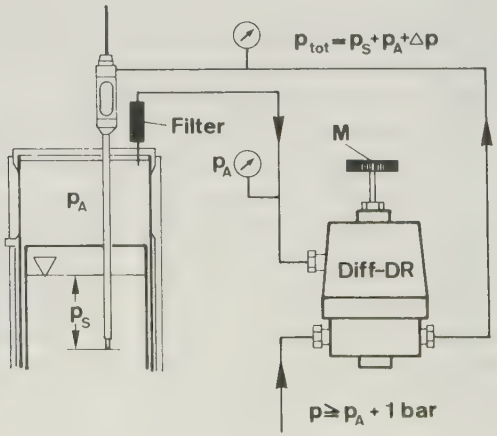


Abb. 42: Drucküberlagerung der pH-Elektrode mittels eines Differenz-Druckreglers.

regulierventil vonstatten gehen. Ändert sich der Arbeitsdruck im Reaktionskessel im Laufe des Fermentationsprozesses, empfiehlt sich der Einbau eines Differenz-Druckreglers. Die Druckaufgabe erfolgt über eine permanente äußere Druckquelle, die über das Differenz-Druckrelais mit dem Reaktionsgefäß in Verbindung steht. Mit diesem Druckrelais kann der erforderliche Differenzdruck Δp eingestellt werden. Das Einstellen von Δp erfolgt mittels der Vorspannschraube M (vgl. Abb. 42).

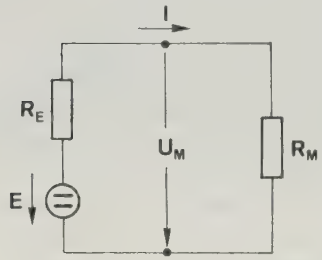
9.2.2. pH-Verstärker

Um das Elektrodenpotential möglichst unverfälscht an die Eingangsklemmen des Meßverstärkers zu bringen, muß der Eingangswiderstand der Meßschaltung um einige Größenordnungen höher sein als der Widerstand der Meßelektrode. Der letztere liegt meist zwischen 100 und 1000 MOhm (bei Raumtemperatur). Um brauchbare Meßresultate zu erhalten, muß der Eingangswiderstand 100 - 1000 mal größer sein als der Meßkettenwiderstand, also 10^{10} bis 10^{12} Ohm (61). Abb. 43 zeigt den Zusammenhang zwischen Elektrodenpotential E und Klemmenspannung U_M.
Zur pH-Meßverstärkung dient das Einbaugerät Typ 400 der Firma Knick, Berlin. Dieses weist folgende technische Daten auf:

- Meßumfang	5 oder 10 ΔpH, umschaltbar
- Ausgang	0...20 mA, max. 5.5 V eingeprägter Strom
- Eingangswiderstand	$>10^{12}$ Ohm
- Meßfehler	<0.03 pH bei 500 MOhm
	<0.05 pH bei 2000 MOhm
- Verstärker	Diodenmodulator
- Drift	<0.1 mV/Jahr
- Elektrodenanpassung:	
Kennlinienverschiebung	0...-8 ΔpH
Steilheit	55...59.5 mV/pH (25° C)
Temperaturkompensation	0...100° C manuell

- Elektrodenanschluß	Normbuchse DIN 19262
- Hilfsspannungsausgang	14 V- für Versorgung pH-Trennverstärker

Der extrem hochohmige Verstärkereingang erlaubt, beliebige pH-Elektroden zu verwenden.
Auf eine automatische Temperaturkompensation kann bei Fermentationen in der Regel verzichtet werden, da die Temperatur des Meßgutes während des ganzen Prozesses konstant gehalten wird.



E = EMK der Elektrode
R_E = Elektrodenwiderstand
U_M = Klemmenspannung am Verstärker
R_M = Eingangswiderstand des Verstärkers
I = Meßstrom

$$U_M = E - I \cdot R_E \qquad U_M = I \cdot R_M \quad \text{bzw.} \quad I = \frac{U_M}{R_M}$$

$$U_M = \frac{E \cdot R_M}{R_M + R_E}$$

$$U_M = E \frac{1}{1 + \frac{R_E}{R_M}} \rightarrow\rightarrow \quad 0 \text{ wenn } R_M \gg R_E$$

Abb. 43: Zusammenhang zwischen Elektrodenpotential E und Klemmenspannung U_M unter Berücksichtigung des Elektrodenwiderstandes R_E und des Eingangswiderstandes R_M des Verstärkers.

Prüfen und Eichen von pH-Elektroden

Es besteht vielfach noch Unsicherheit darüber, wie eine bereits länger im Gebrauch stehende Elektrode vom Benutzer selbst überprüft und beurteilt werden kann.
Allgemein ist zur Behandlung von pH-Elektroden zu bemerken:

- Die Membran der Elektrode soll nicht durch Abreiben getrocknet werden (verursacht statische Aufladung).
- Ob die Elektrodenmembran in 3-molarem KCl oder in destilliertem Wasser aufbewahrt wird, ist nicht entscheidend. Kombinierte Elektroden werden vorzugsweise im Bezugselektrolyten aufbewahrt.
- Eine einmal in Betrieb genommene Elektrode nicht mehr trocken aufbewahren.

Für die Prüfung benötigt man folgende Ausrüstung:

- Ein pH-Meter mit mV-Skala (1 mV/Skalenteil) oder ein digital anzeigendes Äquivalent (z.B. Orion Digital-pH/mV-Meter, Modell 701-00)
- Eine Test-Bezugselektrode (z.B. Ingold Typ 373), die ausschließlich für diesen Zweck reserviert bleibt und sachgemäß aufzubewahren ist.
- Pufferlösungen pH 4 und pH 7, sowie gesättigte KCl-Lösung
- Ev. ein Adapter mit hochohmigem Umschalter (vgl. Abb. 44).

Dieser Adapter - er wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Dr. W. Ingold, Zürich/Schweiz, entwickelt - ermöglicht eine bequeme Überprüfung sowohl für Einzel- als auch für kombinierte Elektroden. Da bei allen kombinierten Elektroden das Bezugselektrodenpotential über den Kabelschirm weggeführt wird, muß dieses am Kabelende entweder am Kabel- oder Stekkerschirm (DIN-Stecker) abgenommen werden. Um sich das Umstecken von Steckern und das Abgreifen der Einzelpotentiale mittels zusätzlichem Litzenkabel und Krokodilklemme zu ersparen, werden die verschiedenen Meß-Schaltungen über einen Umschalter im Adapter realisiert.

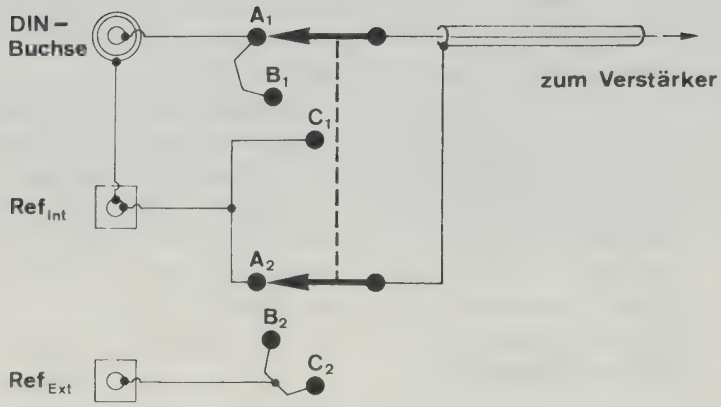


Abb. 44: Adapter für die Überprüfung von pH-Elektroden

Prüfung der Bezugselektrode:

Schalterstellung I: Die zu prüfende Bezugselektrode ist mit dem hochohmigen Eingang, die Test-Bezugselektrode mit dem Bezugselektrodeneingang des pH-Meters verbunden.

Potential in Puffer pH 4 = ... mV
Potential in Puffer pH 7 = ... mV
Potential in ges. KCl-Lösung = ... mV

Diese drei Potentiale dürfen untereinander nicht mehr als 2 mV abweichen. Sofern die Test-Bezugselektrode und die zu prüfende Bezugselektrode das gleiche Ableitsystem aufweisen (Typ 373 hat ein Ag/AgCl-Ableitsystem), müssen alle drei Potentiale innerhalb des Bereichs -10 bis +10 mV liegen.

Wenn die Potentiale mehr als 10 mV vom Sollwert abweichen, so ist der Bezugselektrolyt zu erneuern.

Wenn die Potentiale unter sich stark verschieden sind, ist das Diaphragma verschmutzt:

- Dunkel gefärbte, mit Silbersulfid verunreinigte Diaphragmen sind mit saurer Thioharnstoff-Lösung bis zur Entfärbung zu behandeln (Dauer: einige Stunden). Der Bezugselektrolytraum muß vor der Behandlung entleert werden. Dies kann wie folgt umgangen werden: man fülle die Wässerungskappe teilweise mit der Reinigungslösung, schiebe sie auf den Elektrodenschaft, so daß das Diaphragma innerhalb der Kappe zu liegen kommt und stelle die Elektrode mit dem Kopf nach unten auf.
- Proteinbelegte Diaphragmen werden mit Pepsin-Salzsäure-Lösung (5 % Pepsin in 0.1 n HCl) behandelt. (Einwirkungszeit: einige Stunden). Falls beide Verunreinigungen vorliegen, müssen beide Reiniger nacheinander angewendet werden.

Prüfung der Meßelektrode:

Schalterstellung II: Die Meßelektrode ist mit dem hochohmigen Eingang, die Test-Bezugselektrode mit dem Bezugselektrodeneingang des pH-Meters verbunden.

Schalterstellung III: Die Meßelektrode ist mit dem hochohmigen Eingang, die eingebaute Bezugselektrode mit dem Bezugselektrodeneingang des pH-Meters verbunden (Meß-Schaltung für kombinierte pH-Elektroden).

Die Potentialdifferenz E zwischen Puffer pH 4 und pH 7 ist gegen die eingebaute oder die Test-Bezugselektrode zu messen (Temperatur 20 - 25° C).

E (in Puffer pH 4) minus E (in Puffer pH 7) soll zwischen 172 und 176 mV liegen.

Falls Potentialdifferenz <172 mV: Regeneration mit Flußsäure versuchen (5 %ige Lösung, Einwirkzeit: 20 sec.). Nach dieser Behandlung abspülen und über Nacht in Wasser stehen lassen.

Wenn Potentialdifferenz <150 mV: Meßelektrode ersetzen, da sie nicht mehr regenerierbar ist.

Ansprechzeit der Meßelektrode:

- Elektrode in Puffer pH 4 eintauchen und Potential gegen Bezugselektrode messen.
- Elektrode mit Puffer pH 7 oder KCl-Lösung abspülen.
- Elektrode abtupfen
- Elektrode in Puffer pH 7 eintauchen und Potential nach 1 min und nach 2 min ablesen.

Die Potentialdifferenz zwischen dem Wert nach 1 min und demjenigen nach 2 min darf nicht größer als 3 mV sein.
Bei langsamer Anzeige: Flußsäure-Behandlung.

Eichen:
Grundlage jeder Direktanzeige ist, daß die Eichgerade (Kennlinie) der Anzeigeskala angepaßt wird.
An der Membran einer Glaselektrode ergibt sich im Idealfall die Spannungsdifferenz = 0 zwischen der Membran-Innen- und der Außenseite, wenn diese mit einer Lösung gleichen pH-Wertes in Berührung stehen. Aus verschiedenen Gründen ist diese Spannungsdifferenz meist$\neq$0, und ihr Betrag ist das sogenannte Asymmetriepotential U_{AP}. Dieses kann zeitlich schwanken. Wegen dieser Spannung, die eine unbekannte Größe ist, ist die Klemmenspannung einer Glaselektroden-Meßkette nicht absolut definiert.
Der Temperatureinstellknopf des pH-Meters bestimmt die Steigung der Geraden (Isothermen). Der geräteinterne Drehpunkt der Anzeigeskala bei Variation des Temperatureinstellknopfes liegt bei einer Meßkettenspannung von Null (vgl. Abb. 46).

Die Kennlinienverschiebung (Nullpunkt, Asymmetriepotential) kann an einem separaten Einstellpotentiometer abgeglichen werden. Die zeitlich bedingte Abnahme der Elektroden-Steilheit läßt sich am Verstärker am Steilheitspotentiometer $\Delta U/\Delta pH$ kompensieren. Korrekterweise müßte bei der Eichung zuerst die Elektroden-Steilheit ermittelt werden, um diesen (momentan gültigen) Wert am pH-Meter einstellen zu können.

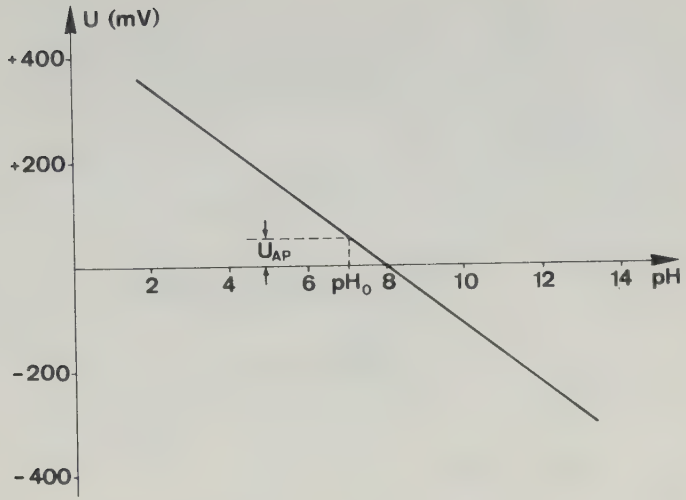


Abb. 45: Klemmenspannung einer Glaselektrode als Funktion des pH-Wertes.
U = Klemmenspannung; pH_o = pH-Wert der Glaselektroden-Füllung; pH = pH-Wert der Meßlösung.

Für die Eichung bei Fermentationen ist wichtig, daß die Meßtemperatur während der gesamten Prozeßdauer konstant bleibt. Wird die Eichung zudem bei dieser Temperatur vorgenommen, kann auf eine experimentelle Ermittlung der Steilheit und des Isothermen-Schnittpunktes der Elektrode verzichtet werden.

Die Eichung kann folgendermaßen durchgeführt werden:

- Mit Puffer pH 7 (auf Meßtemp.) wird der Elektroden-Nullpunkt (Asymmetriepotential) eingestellt.
- Mit einem zweiten Puffer (auf Meßtemp.), der möglichst nahe am Meßpunkt liegt, wird mit dem Steilheitspotentiometer dieser Pufferwert eingestellt.

Steilheits- und Temperaturpotentiometer haben - elektrisch gesehen - die gleiche Funktion: Sie verändern den linearen Verstärkungsgrad.

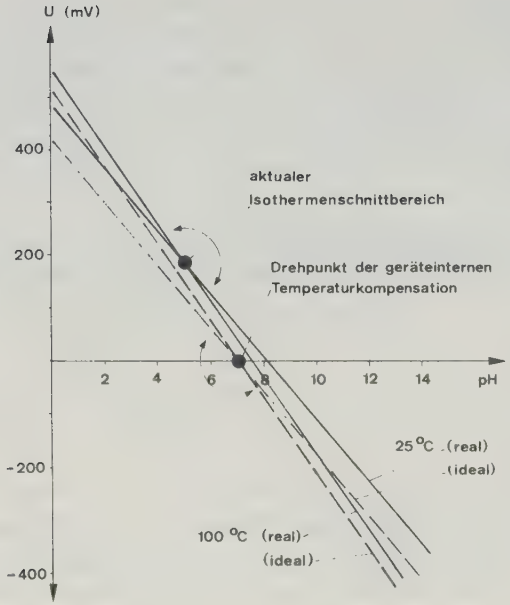


Abb. 46: Meßketten-Isothermen (theoretisch und real)

9.2.3. pH-Regler

Aufgrund des logarithmischen Zusammenhanges zwischen der Wasserstoffionenkonzentration und dem der Messung zugänglichen pH-Wert weist die pH-Regelstrecke Unlinearitäten auf, die Planung und Betrieb einer solchen Anlage erschweren.

Die Einstellung eines vorgewählten Sollwertes durch selbsttätige Zugabe eines Reagens ist beim Chargenverfahren eine im großen Maßstab durchgeführte Titration, deren Gesetzmäßigkeiten sinngemäß übernommen werden können. Der Kurvenverlauf einer Titration ist in Abb. 47 wiedergegeben.

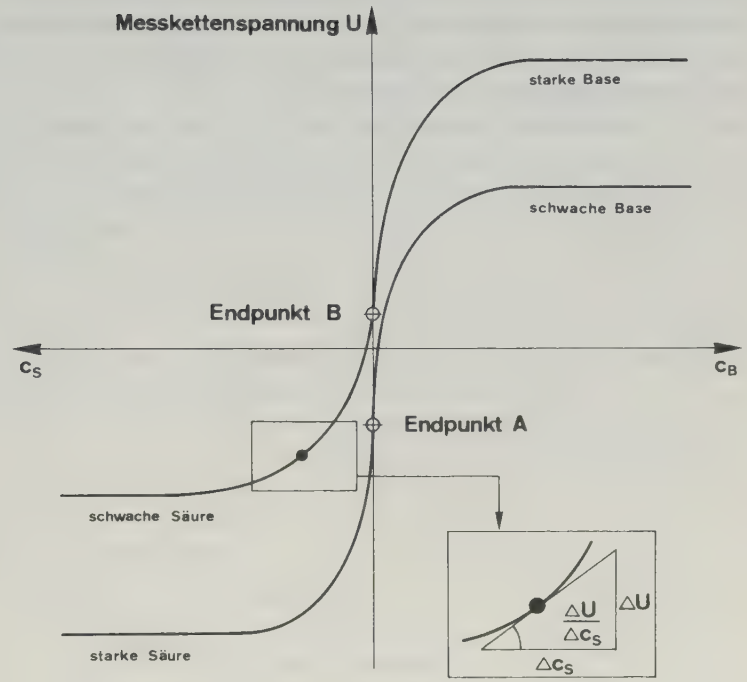


Abb. 47: Schematische Darstellung einer Titrationskurve

Der Pufferwert entspricht dem Reziprokwert der Kurvensteilheit, also $\Delta c/\Delta U$, die Regeltoleranz ist ΔU und die Dosiergenauigkeit Δc. Es liegt in der Natur der chemischen Reaktion, daß bei steilen Titrationskurven, also bei kleinem Pufferwert, die Dosierung der Korrekturchemikalie durch den Regler für eine bestimmte Genauigkeit überaus fein erfolgen muß.

Die Titrationskurve mit ihrer nicht-linearen Charakteristik bestimmt die chemische Reaktion während der gesamten Regelung. In einer richtig dimensionierten Regelstrecke werden

aber niemals so große Regelabweichungen auftreten, daß die nicht-lineare Kurvencharakteristik spürbar würde. Die Schwankungen der Regelgröße von der Führungsgröße sind in der Praxis derart klein, daß deren Abweichungen durch Geraden approximiert werden können.
Bei der pH-Regelung treten nur Regelstrecken mit Ausgleich auf, d.h. die Regelgröße x strebt nach einer gegebenen Stellgrößenänderung oder Störung einem bestimmten neuen Endwert zu. Je nach Geometrie und Rührerleistung (Mischzeit) des Reaktionskessels, Art und Geschwindigkeit der chemischen Reaktion ist diese Regelstrecke mit einer oder mehreren Verzögerungen behaftet.
Geeignete Stellglieder für Reagentienzugabe sind Magnetventile, Dosierventile und -pumpen (vgl. III.6.). Wegen ihrer binären Durchlaß-Charakteristik werden vorzugsweise Impulsregler mit PID-Verhalten eingesetzt.
Da in Fermentationsprozessen kaum Störungsspitzen auftreten, können ebenfalls Dreipunkt-Regler verwendet werden. Der für die pH-Regelung eingesetzte Regler weist die folgenden technischen Daten auf:

- Typ	Protronic UG 2, Hartmann & Braun AG, Frankfurt/Main
- Funktion	Kontaktloser Servo-Anzeiger mit Vorverstärker, Schirmkondensator-Abgriff und Schwinganker-Schrittmotor, zusätzlich berührungslose Stellungsabtastung
- Eingang	0...20 mA
- Skala	plan, 100 mm lang, strom- und spannunslinear
- Einstellzeit	<2.5 s
- Anzeigefehler	<1 %
- Grenzwerte	1 Min.- und 1 Max.-Grenzwert, einstellbar von 0...100 %, minimaler Abstand 2.5 %.

- Reproduzierbarkeit
  - Schaltpunkte $< \pm$ 0.25 % vom Meßbereichsumfang
  - Schaltdifferenz $\pm$ 0.25 % vom Meßbereichsumfang
- Ausgang: je 1 Relais mit potentialfreiem Wechsler für max. 250 V~, max 4 A~ bei cos φ = 1.

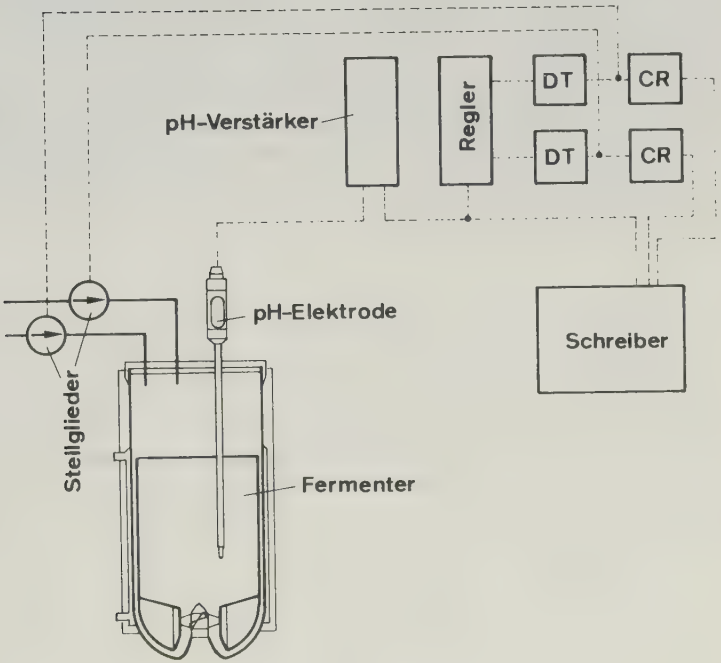


Abb. 48: Aufbau des pH-Regelkreises mit Reagentienverbrauch-Registrierung: DT, Doppeltimer; CR, Verbrauchsregistrierung.

Zur Anpassung an die Regelstrecke werden dessen Ausgangssignale durch Doppeltimer getaktet (vgl. III.7.1.). Diese Geräteanordnung bringt folgende Vorteile:

- Sie ist sehr einfach und bedienungsfreundlich und kann daher auch von Nicht-Fachleuten den jeweiligen Prozessen angepaßt werden. Der Sollwert liegt zwischen den beiden Grenzwertzeigern. Durch Verstellen des einen kann eine Totzone geschaffen werden, sodaß beim Anfahren aufgrund der geringen Pufferkapazität des Kulturmediums ein Aufschaukeln vermieden werden kann. Die Taktzeit darf in keinem Fall kürzer als die Mischzeit gewählt werden.
- Die digital vorwählbare konstante Impulszeit ermöglicht mit dem entsprechenden Stellglied eine genaue Dosierung. Der Reagentienverbrauch läßt sich über die zeitliche Integration der Impulse auf dem Schreiber festhalten (vgl. III.7.1.).

9.3. O_2, CO_2 und flüchtige Substanzen

Das primäre Ziel dieses Abschnittes ist es, Analysenmethoden vorzustellen, die eine permanente Messung von Sauerstoff und Kohlendioxid, sowohl im gasförmigen wie im gelösten Zustand erlauben. Die einzelnen Verfahren sind in Tab. 3 aufgeführt, die jedoch nicht für sich in Anspruch nimmt, vollständig und auf längere Zeit gültig zu sein.
In keinem Gebiet der Fermentationstechnik wurden in den letzten Jahren und werden heute noch derart große Anstrengungen unternommen, wie bei der Erfassung dieser beiden Komponenten. Aus diesem Grund werden sicher in nächster Zukunft die bereits eingeführten Verfahren durch Neuentwicklungen ergänzt.

Die Wahl des Analysenverfahrens ist eine Frage der erwünschten Genauigkeit, der Weiterverarbeitung der Meßwerte (Registrierung, analoge Regelung, computergesteuerter Prozeß),

Tabelle 3 Mögliche Analysenverfahren für Gase und flüchtige Substanzen.
●geeignet, ○ungeeignet, ◉geeignet mit "Tubing-System"

O_2		CO_2		andere	
gasf.	gelöst	gasf.	gelöst	Komponenten	Analysen-System
○	●	○	○		elektrochem. Sensoren
●	◉				paramagnetisch
		●	◉		Infrarot
●	◉	●	◉	●	Gas-Chromatographie
●	●	●	●	●	Massenspektrometer

der Betriebssicherheit und nicht zuletzt der Anschaffungs- und Betriebskosten.
Elektrochemische Sensoren gestatten eine direkte Messung der jeweiligen gelösten Gaskomponente. Die restlichen, in Tab. 3 aufgeführten Verfahren eignen sich hingegen nur für Analysen im gasförmigen Zustand und werden daher vor allem für die Abluft-Analyse eingesetzt.
Mit der "Tubing method" (3) gelingt es jedoch, diese auch für eine indirekte Bestimmung von gelösten Gasen anzuwenden. Das System besteht aus einer gaspermeablen Schlauchwicklung aus Teflon oder Polypropylen, die in die Kulturflüssigkeit eingebracht wird. Durch diese Spirale wird ein inerter Trägergasstrom (Helium oder Stickstoff) geleitet, der die durch die Schlauchwandung diffundierenden Gase zu den externen Analysengeräten führt. Das System ist verständlicherweise mit allen Nachteilen, die die Diffusion beeinträchtigen, behaftet. Verzögerungszeiten von 2 bis 10 Minuten machen es sehr träge, so daß es nur für Messungen, nicht aber für Re-

gelungszwecke in Frage kommt. Die Erfassung von Gasen und flüchtigen Substanzen, die für gewisse mikrobiologische Prozesse Bedeutung haben, mittels eines Massenspektrometers, gehört wohl zu den spektakulärsten Neuerungen in der Fermentationstechnik.

9.3.1. Sauerstoff-Elektroden

Je nach Konzentrationsbereich und dem zu untersuchenden Medium lassen sich geeignete Meßzellen auswählen. Grundsätzlich unterscheidet man dabei konduktometrische, polarographische und amperometrische Verfahren. Die einfachsten Anordnungen basieren auf dem konduktometrischen Prinzip, wobei die Leitfähigkeitsänderung eines bestimmten Mediums zugrunde gelegt wird. Diese Meßzellen werden z.B. zur Kontrolle von Kesselspeisewasser eingesetzt.
Obwohl membranlose Sauerstoffelektroden oft für biologische Systeme verwendet wurden (63), arbeitet man heute ausschließlich mit membranbestückten Elektroden. Die Membran isoliert die Zelle nicht nur chemisch und elektrisch vom Testmedium, sondern verhindert Kontakt und Vergiftung der Kathode durch Ionen, Proteine und andere Substanzen.
Die polarographische Sauerstoffelektrode nach dem Prinzip von CLARK (32), das in der US-Patentschrift 2 913 386 beschrieben ist, stellt eine universell einsetzbare Meßzelle dar. Diese Sonden verwerten die Größe der Depolarisationswirkung von Sauerstoff in einer speziellen polarographischen Zelle. In der einfachsten Form besteht eine derartige Zelle aus einer Kathode und Anode, die durch einen Elektrolyten miteinander verbunden sind. Als Kathoden dienen gewöhnlich Edelmetalle wie Gold, Platin und Silber. Die Anode besteht in den meisten Fällen aus Silber. Die Zelle ist von der Meßlösung durch eine Diffusionsmembran getrennt, die nur für Gase, nicht aber für Flüssigkeiten durchlässig ist. Nach dem Eintritt von Sauerstoff durch die Membran findet eine chemische Reaktion statt. Die Kathode wird gegenüber der

Anode auf ein bestimmtes und konstantes Potential gebracht, sodaß der Sauerstoff selektiv und vollständig an der Kathode reduziert wird. Die elektrochemische Basis der Sauerstoffreduktion ist in Abb. 49 wiedergegeben. Es wurde jeweils der aus der angelegten negativen Spannung resultierende Strom gemessen. In Abwesenheit von Sauerstoff (Kurve 1) ist der Strom Null bis ungefähr -0.8 Volt (Punkt D). Danach steigt er steil an. Die Zunahme bei diesem Potential ist auf die Reduktion von Wasser zurückzuführen, bei der Wasserstoff entsteht:

$$2\ H_2O + 2\ e^- \longrightarrow 2\ OH^- + H_2$$

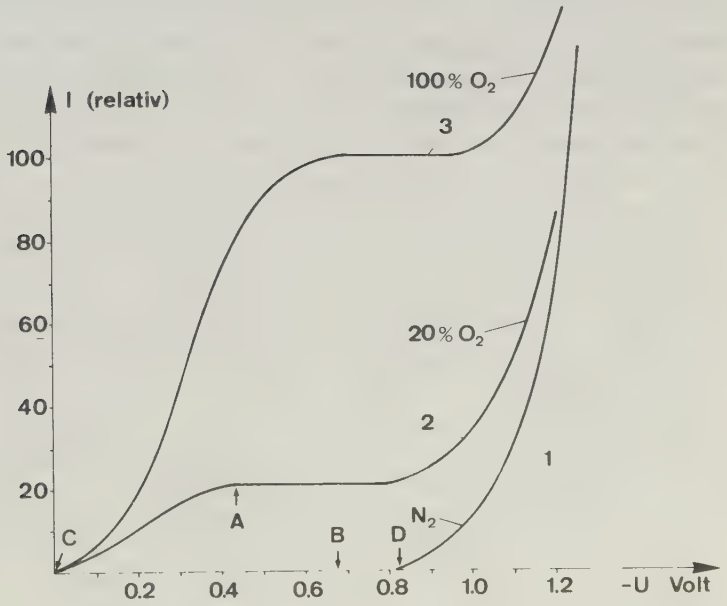


Abb. 49: Typische Strom-Spannungs-Kurve in gerührter 0.1 M KCl-Lösung (63). Die Diskussion der Kurven ist dem Text zu entnehmen.

Die Anwesenheit von Sauerstoff ist deutlich in den Kurven 2 und 3 durch den beginnenden Stromfluß bei Punkt C manifestiert. Dieser steigt bis zu etwa -0.5 Volt (Punkt A) an, wo er solange auf einem gleichbleibenden Wert verharrt, bis die Wasserreduktion einsetzt (Punkt D). Der grundlegende Unterschied zwischen den Kurven 2 und 3 liegt in der Höhe des Plateaus: mit reinem Sauerstoff ist dieses ca. 5 mal höher als mit Luft (20.9 % O_2), d.h. der Strom ist direkt proportional zur Sauerstoffkonzentration in der Probe. Die Sauerstoffkonzentration an der Elektrodenoberfläche ist eine Funktion des Potentials und nimmt mit steigendem Wert letzteren bis zum Punkt A ab, wo sie sehr nahe Null ist, d.h. oberhalb -0.5 Volt (Punkt A) ist die gemessene Sauerstoffkonzentration mit der in der Meßlösung identisch. Bei Punkt B dürfte daher das optimale Potential für die Analyse liegen, da sich dieser Punkt erstens auf dem Plateau und zweitens weit genug von der Region, wo die Wasserreduktion einsetzt (Punkt D), befindet.
An Kathode und Anode spielen sich folgende Vorgänge ab:

Kathode: $O_2 + 2\ H_2O + 4\ e^- \longrightarrow 4\ OH^-$

Anode: $4\ Ag \longrightarrow 4\ Ag^+ + 4\ e^-$

Die Reduktion von Sauerstoff an der Kathode führt zu einem elektrischen Stromfluß zwischen Anode und Kathode.
Bei amperometrischen Sauerstoffelektroden ist der Elektrodenstrom I die Meßgröße. Dieser ist dem Sauerstoffgehalt der Meßlösung direkt proportional. Neben dem Sauerstoffgehalt beeinflußt noch eine Reihe anderer Parameter die Größe des Elektrodenstroms. Dies geht aus der folgenden Gleichung hervor:

$$I = K \frac{a\, p_{O_2}}{\frac{X_M}{P_M} + \frac{X_E}{P_E}} + I_R$$

I = Elektrodenstrom
I_R = Reststrom oder Nullstrom
K = Konstante
a = Kathodenoberfläche
X_E = Elektrolytfilmdicke
p_{O_2} = Sauerstoffpartialdruck in der Meßlösung
X_M = Membrandicke
P_M = Membranpermeabilität
P_E = Elektrolytpermeabilität

Diese Sauerstoffbestimmung ist demnach nur dann genau und zuverlässig, wenn alle strombestimmenden Parameter mit Ausnahme des Sauerstoffpartialdruckes p_{O_2} über längere Zeit konstant bleiben. Insbesondere muß die Elektrodensteilheit dI/dp_{O_2} und der Nullstrom konstant bleiben. Bei konstantem Druck und konstanter Temperatur ist diese Voraussetzung weitgehend erfüllt.

Die galvanischen Sauerstoffelektroden stellen eine weitere Gruppe amperometrischer Meßzellen dar. Der Elektrolyt bildet mit der relativ edleren Kathode und der unedlen Anode eine galvanische Zelle, die durch eine gaspermeable Membran von der Meßlösung getrennt ist. Unter Einhaltung bestimmter Bedingungen liefert die galvanische Kette einen meßbaren elektrischen Strom, dessen Größe allein von der Sauerstoffkonzentration in der Meßlösung abhängt. Ihre Arbeitsweise beruht auf der Nernstschen Gleichung. Somit ist bei eingestelltem Verteilungsgleichgewicht der von dem galvanischen Element gelieferte elektrische Strom ein direktes Maß für die Sauerstoffkonzentration in der Probe. Die an den Elektroden ablaufenden Vorgänge ähneln den Reaktionen, die bei der polarographischen Meßzelle ablaufen. Im Unterschied dazu läuft die Reaktion jedoch von selbst an, d.h. es ist keine äußere Spannungsquelle erforderlich. Quantitativ werden die Vorgänge dadurch bestimmt, daß im Elektrolyten gelöste

Sauerstoffmoleküle durch Diffusion an die Edelmetallkathode gelangen und bei einem geeigneten Potential zu Hydroxyl-Ionen reduziert werden. An der Anode wird eine äquivalente Menge Substanz umgesetzt. An Kathode und Anode spielen sich folgende Reaktionen ab:

Kathode: $O_2 + 2\ H_2O + 4\ e^- \longrightarrow 4\ OH^-$

Anode: $4\ OH^- + 2\ Pb \longrightarrow 2\ PbO + 2\ H_2O + 4\ e^-$

Zwei Bedingungen müssen für ein sauberes Arbeiten mit amperometrischen - sowohl polarographischen wie galvanischen - Elektroden erfüllt sein: Erstens muß die Elektrode ein Potential aufweisen, das nur die zu analysierende Spezie selektiv reagieren läßt. Überdies muß das Potential ausreichend anodisch oder kathodisch sein, um sicherzustellen, daß der eindiffundierende Sauerstoff an der Elektrode vollständig reagiert, d.h. die Sauerstoffkonzentration an der Kathodenoberfläche muß Null oder sehr nahe Null gehalten werden (vgl. Abb. 49). Zweitens muß eine fixierte und konstante Diffusionsgeometrie zwischen der Elektrodenoberfläche und der Probe aufrechterhalten werden. Die Funktion der Membran besteht daher nicht nur darin, die Meßzelle chemisch und elektrisch von der Meßlösung zu isolieren, sondern diese fixe Diffusionsgeometrie zu gewährleisten. Der Einfluß der Elektrolytfilmdicke auf die Eigenschaften der Elektrode ist anschaulich in einer Arbeit von VOGEL (112) beschrieben. Die Leichtigkeit, mit der Moleküle eine Membran passieren, wird durch den Permeabilitäts-Koeffizienten ausgedrückt. Dieser ist eine Funktion der Zusammensetzung der Membran und kann angegeben werden durch eine Menge einer Substanz, die eine definierte Membran einer bestimmten Dicke bei gegebener Temperatur und gegebener Partialdruckdifferenz passiert. Die Permeabilität nimmt mit der Kondensationstemperatur der Substanz zu. Die Löslichkeit des Gases im Polymer variiert exponentiell mit dem Siedepunkt. Folglich ist der Permeabilitäts-Koeffizient für Wasser im allgemeinen größer

als der für Kohlendioxid, dieser ist größer als der für Sauerstoff. Das Diffusionsvermögen eines Gases ist nicht ausschließlich der kontrollierende Faktor, der den Permeabilitäts-Koeffizienten bestimmt. Dieser ist das Produkt aus Diffusions-Koeffizient des Gasmoleküls im Polymer mal der Löslichkeit des Gases in diesem Polymer. Mathematische Abhandlungen über membranbestückte Elektroden werden erschwert durch die Unregelmäßigkeiten, die an den Grenzflächen der verschiedenen Phasen auftreten. MANCY et al. (68), BRIGGS et al. (20) und AIBA et al. (2) gingen dieses Problem an, indem sie verschiedene Vereinfachungen einführten. Der einfachste Weg, dieses System qualitativ zu analysieren, besteht darin, dieses als eine Serie von Scheinwiderständen aufzufassen. Der Elektrodenstrom für einen gegebenen Sauerstoffpartialdruck kann daher ausgedrückt werden als:

$$I = K \frac{a \cdot p_{O_2}}{Z_{total}}$$

wobei K eine Konstante, a die Kathodenoberfläche und $Z_{total} = Z_k + Z_e + Z_m + Z_s$ ist.

Z_k ist die elektrochemische Impedanz der Reduktion des Sauerstoffmoleküls an der Kathode und ist so klein, daß es für alle praktischen Anwendungen vernachlässigt werden kann. Z_e, Z_m und Z_s sind die Stoffübergangs-Widerstände der Elektrolytschicht, der Membran und der Probe. Z_e ist eine Funktion der Ionenstärke des Elektrolyten, der Temperatur und der Filmdicke. Z_m ist umgekehrt proportional zur Permeabilität des Membranmaterials und zur Temperatur und direkt proportional zur Dicke. Z_s ist ein Maß für die Leichtigkeit, mit der Sauerstoff an die Membranoberfläche gelangen kann. Dies ist eine Funktion des Sauerstofftransfers in der Probe. Da sich membranbestückte Elektroden sowohl zur Messung von gasförmigem wie von gelöstem Sauerstoff einsetzen lassen, ist Z_s ein wichtiger Faktor, da sein Wert um mehrere Zehnerpotenzen zunehmen kann beim Übergang von gasförmigen zu wäss-

rigen Proben. Der Sauerstoffdiffusions-Koeffizient ist in Luft ungefähr um vier Zehnerpotenzen größer als in wässriger Lösung, d.h. 0.3 cm^2/sec bzw. 2 x 10^{-5} cm^2/sec. Dadurch wird, obwohl bei Messungen in der Gasphase Z_e und Z_m dominieren mögen, Z_s bei Messungen in wässrigen Lösungen limitierend.

Da, im Gegensatz zu potentiometrischen, amperometrische Sensoren die zu messende Spezie durch die chemische Reaktion verbrauchen, entsteht außerhalb der Membran ein Konzentrations-Gradient. Unter gerührten Bedingungen existiert an die Membran angrenzend eine hypothetische, stagnierende Schicht der Lösung, die Nernstsche Diffusionsschicht genannt wird. In dieser stagnierenden Schicht ist der Sauerstoffkonzentrations-Gradient enthalten (vgl. Abb. 50). Da die Dicke dieser Schicht eine Funktion der Rührbedingungen ist (65), wird sich die Elektrode nur reproduzierbar verhalten, solange diese Bedingungen konstant bleiben.

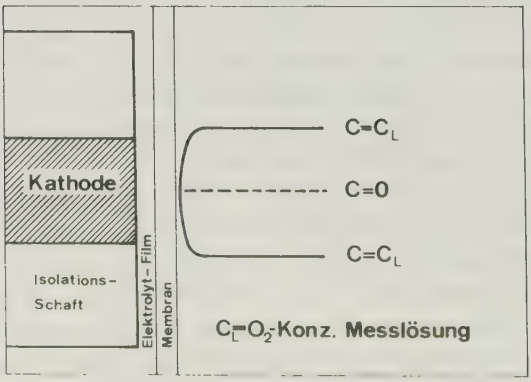


Abb. 50: Darstellung des Sauerstoff-Gradienten-Profils (63).

Der Output einer Elektrode bei einem gegebenen Sauerstoffpartialdruck kann leicht erhöht werden, entweder durch Vergrößern der Kathodenoberfläche und/oder durch Einsetzen einer dünneren Membran. Beide Methoden zeigen aber Nachteile. Der Sauerstoffverbrauch ist proportional zum fließenden Strom, und der ist proportional zur Kathodenoberfläche. Die Zone in der Membran, durch welche der größte Teil des Sauerstoffes diffundiert, ist nicht viel größer als die Kathodenoberfläche. So wie diese Zone vergrößert wird, steigt der Grad der Erschöpfung an Sauerstoff innerhalb dieser Region, wie aus Abb. 50 zu ersehen ist. Tatsächlich breitet sich dann ein Teil dieses Konzentrations-Gradienten in die Meßlösung aus. Dadurch wird die Messung gegenüber Änderungen der Flußrate und des Profils empfindlich. Dieser Effekt tritt aber nur bei wässrigen Proben auf. Bei Verwendung sehr dünner Membranen aus hochpermeablen Polymeren zur Erhöhung des Outputs treten verschiedene Nachteile auf: Einerseits nimmt durch den erhöhten Sauerstoff-Flux die Strömungsempfindlichkeit zu, andererseits verändert der nun vermehrt einsetzende Wassertransport durch die Membran die Zusammensetzung des Elektrolytfilms. Die Permeabilität dieser polymeren Membranen ist für Wasser höher als für Sauerstoff. Das Verhältnis der Wasser-Permeabilität zur Sauerstoff-Permeabilität bewegt sich von 6 im Falle von Teflon zu 60 für Dimethyl-Silikon-Kautschuk bis zu 2500 für Mylar (63). Im Extremfall kann die Elektrolytschicht austrocknen, was ein längeres Funktionieren der Elektrode ausschließt.

Abb. 51 zeigt eine vereinfachte Darstellung des Sauerstoff-Transportes von der Gasblase an die Sauerstoffelektrode. Für die Annahme, daß der Flüssigkeitsfilm an der Membranoberfläche von gleicher Dicke ist wie der einer großen Blase in der selben Flüssigkeit, konnte HEINEKEN (52) zeigen, daß die Membran dem Sauerstofftransfer einen größeren Widerstand entgegenstellt als der angrenzende Flüssigkeitsfilm. Der Unterschied beträgt ca. drei Zehnerpotenzen. An dieser Stelle sollte hervorgehoben werden, daß Sauerstoffelektroden die Aktivität und nicht die Konzentration

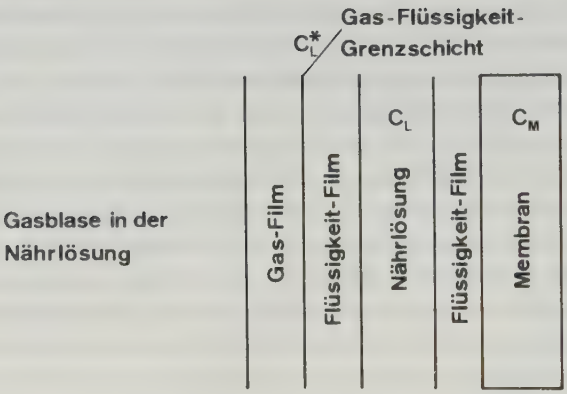


Abb. 51: Sauerstoff-Transport von der Gasblase an die Sauerstoffelektrode (52).

des Sauerstoffs messen. Der Grund liegt in der Tatsache, daß die treibende Kraft für den Sauerstofftransport von der Lösung an die Elektrodenoberfläche durch die Differenz dieser beiden Aktivitäten zustande kommt.
Große Fehler bei der Sauerstoffmessung in Fermentern entstehen durch den Einfluß der Turbulenz und des Gasblasenkontaktes. Die Elektrode ist dabei in einem Flüssigkeit-Gas-Dispersionsstrom plaziert, sodaß die Membran alternierend Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt ist, die einmal dem gelösten Sauerstoff in der Flüssigphase, C_L, und dann der Gleichgewichtskonzentration C_L^* in der Blasen-Flüssigkeit- oder Blasen-Membran-Grenzschicht entspricht (65, 113). Aus Untersuchungen von MERTA et al. (69) geht hervor, daß Meßfehler bis zu 20 % durch Blasenkontakt und/oder Flüssigkeitsturbulenz verursacht werden können. Im Falle des Blasenkontakt-Effektes wächst der Fehler mit der Differenz zwischen den Partialdrücken in Gas- und Flüssigphase. Messungen in viskosen Flüssigkeiten sind vor allem empfindlich auf Turbulenz-Einflüsse. Bei schnell ansprechenden Elektro-

den sind diese Effekte ausgeprägter (69).
Wie bereits erwähnt, reagiert die Sauerstoffmessung stark auf Temperaturschwankungen. Da die Messung aber im Fermenter mit hoher Temperaturkonstanz erfolgt, kann auf eine automatische Temperaturkompensation verzichtet werden. Große Druck- und Temperaturunterschiede, wie sie während der Sterilisation bei in-situ-Sensoren auftreten, verändern die Elektrodencharakteristiken (starke Erhöhung des Reststromes und Veränderung der Elektrodensteilheit) oft derart, daß die Elektrode für die betreffende Fermentation nicht eingesetzt werden kann. Die Ursache liegt in einer Deformation der Diffusionsmembran und somit in einer Veränderung der Diffusionsgeometrie. Eine wesentliche Verbesserung stellt die von der Dr. W. Ingold AG in Urdorf/Schweiz weiterentwickelte IL-Sauerstoffelektrode dar. Sie ist druckkompensiert und weist eine Membran mit konstantem Anpressdruck auf. Dadurch werden die Elektrodeneigenschaften durch die Sterilisation mit Heißdampf nur noch geringfügig verändert.

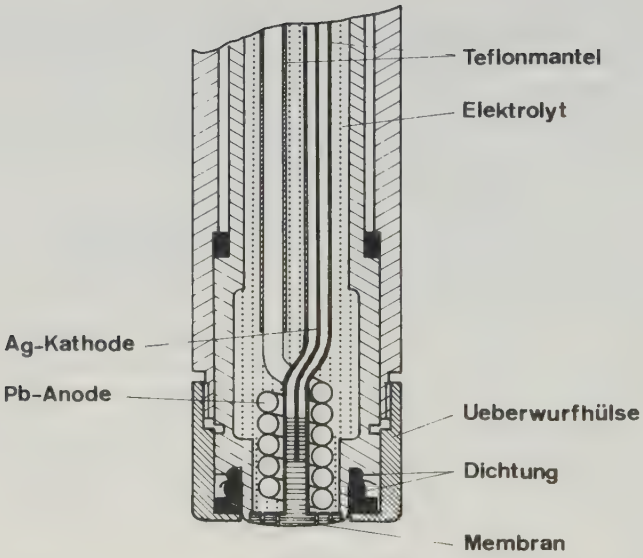


Abb. 52: Galvanische Sauerstoffelektrode, Typ BIOLAFITTE

Technische Daten

- Meßprinzip:	amperometrisch (galvanisch)
- Konstruktions-merkmale:	rostfreie Stahlarmatur, geeignet für senkrechten oder seitlichen Einbau, einfach auswechselbare Membran
- Kathode:	Ag
- Anode:	Pb
- Ansprechzeit:	90 % in 45-60 sec
- Stabilität:	pro Woche besser als $\pm$ 4 %
- Ausgangssignal:	bei luftgesättigtem Milieu ...15 mV

Aufgrund des hohen Ausgangssignals erübrigt sich ein Verstärker. Die Elektrode kann daher direkt an einen Schreiber oder andere Folgegeräte gekoppelt werden.

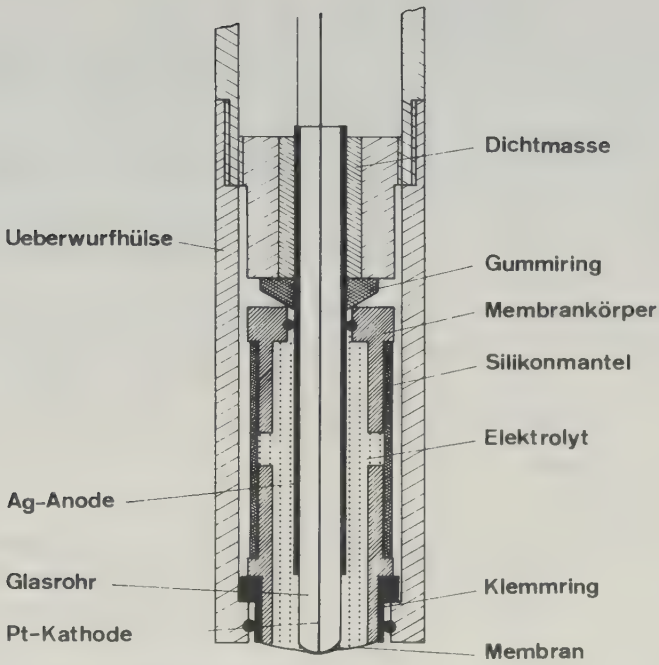


Abb. 53: Polarographische Sauerstoffelektrode, Typ IL 530

Technische Daten

- Meßprinzip:	amperometrisch (polarographisch)
- Konstruktions-merkmale:	rostfreie Stahlarmatur, geeignet für senkrechten oder seitlich geneigten Einbau, vorbereiteter, einfach auswechselbarer Membrankörper
- Kathode:	Pt
- Anode:	Ag/AgCl
- Ansprechzeit:	98 % in weniger als 45 sec
- Stabilität:	(bei konstantem Druck und Temperatur) pro Woche besser als 2 %
- Ausgangssignal:	ca. 10^{-12} - 10^{-7} A

9.3.1.1. Sauerstoff-Verstärker

Der Sauerstoffverstärker Typ IL 531 ist speziell zum Arbeiten mit den polarographischen Elektroden konstruiert. Das von der Sauerstoffelektrode erzeugte Signal wird auf ein eingeprägtes Ausgangssignal von 0...20 mA verstärkt, ist linear und direkt proportional der Sauerstoffkonzentration.

- Bereich-Schalter:	ZERO-Position, Abgleich des Reststromes sowie drei Empfindlichkeitsstufen
- ZERO-Knopf:	Nullpunkt-Abgleich
- BALANCE-Knopf:	Empfindlichkeits-Abgleich (Justierung auf einen Eichwert bekannten O_2-Gehalts)

Technische Daten

- Verstärker:	Volltransistorisiert
- Eingang:	Für IL-Elektroden mit automatischer Temperaturkompensation (überbrückt mit 1 %igem Schichtwiderstand 27 kOhm)
- Meßbereiche:	0...100 mm Hg p_{O_2} 0...200 mm Hg p_{O_2} 0...800 mm Hg p_{O_2}
- Ausgang:	0...20 mA, eingeprägt, 6 V (max. Last 300 Ohm)

Eichen

Es ist sehr wichtig, vor dem Einbau der Elektrode in den Fermenter, eine Eichung vorzunehmen, um so einerseits den Meß-Nullpunkt festzulegen und andererseits die Funktionsfähigkeit der Elektrode zu überprüfen. Dies kann mit einer Zusatzeinrichtung (vgl. Abb. 54) einfach durchgeführt werden.

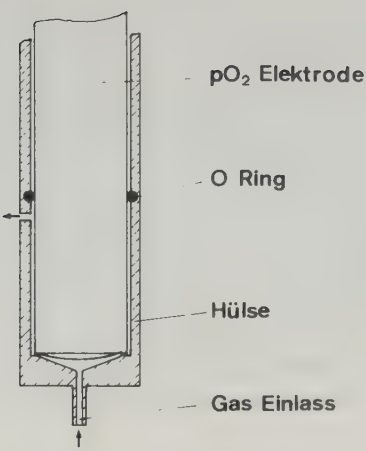


Abb. 54: Hülse zum Begasen der Sauerstoffelektrode (Eigenbau)

Durch Begasen mit Stickstoff läßt sich der Meß-Nullpunkt einstellen:

- Bereich-Schalter auf 100 (empfindlichster Bereich) stellen;
- Warten bis Anzeige stabil;
- mit ZERO-Knopf Anzeige auf Null justieren.

BALANCE (Empfindlichkeits)-Eichung

Als Eichgas dient ein Gas mit bekanntem Sauerstoffgehalt oder am einfachsten Luft. Die untenstehende Formel erlaubt die Berechnung des Sauerstoffes in Luft oder anderen Gasen, ausgehend vom prozentualen Sauerstoffgehalt, dem Barometerdruck und der Temperatur.

$$\text{mm Hg } p_{O_2} = (P_b - P_w) \ \%\ O_2$$

wobei P_b = Barometerdruck in mm Hg

P_w = Wasserdampfdruck in mm Hg (der Luft). Dieser ist einer Tabelle zu entnehmen.

$\%O_2$ = prozentualer Sauerstoffgehalt in Luft oder in einem anderen Gasgemisch

- Meßstellenumschalter auf den Bereich 200 (bei Luft) stellen;
- Elektrode mit Luft oder Eichgas umspülen;
- mit BALANCE-Knopf den errechneten Partialdruck am Meßinstrument einstellen.

Nach erfolgter Sterilisation wird üblicherweise nur der Maximalwert, z.B. 100 % O_2, bei Betriebsbedingungen eingestellt. Erfahrungsgemäß bleibt beim neuen IL-Elektrodentyp der Nullwert unverändert. Verschiebt sich dieser hingegen durch die Sterilisationseinwirkung, wird er mittels einer Stickstoffbegasung des Fermenters neu einjustiert. Sobald die Eichwerte stabil sind, kann der Fermenter angeimpft werden.

9.3.1.2. Regler

Regler und Aufbau der Regelstrecke sind vollständig identisch mit dem pH-Regelkreis. Dieser Sauerstoff-Regelkreis ermöglicht eine Regelung des gelösten Sauerstoffs auf der Basis einer automatischen Zufütterung der Kohlenstoffquelle. Zum Anfahren der Fermentation wird die Sekundärseite des Ausgangsrelais des Maximal-Sollwertes über eine Starttaste, die ein Selbsthalterelais ansteuert, stromlos gehalten. Überschreitet der Istwert den Minimal-Sollwert, fällt das Selbsthalterelais ab, d.h. von diesem Zeitpunkt an kann das Stellglied bei Überschreiten des Maximalwertes angesteuert werden.

9.3.2. CO_2-Elektrode

Die CO_2-Elektrode besteht aus einer kombinierten pH-Elektrode, die in ein mit Elektrolyt gefülltes Rohr eintaucht (Abb. 55); sie folgt daher der Nernst-Gleichung (vgl. III.9.1.1.). Das Rohr ist einseitig mit einer für CO_2 durchlässigen Diffusionsmembran verschlossen. Zwischen Diffusionsmembran und der pH-sensitiven Glasmembran besteht ein dünner Elektrolytfilm. Bei den potentiometrischen Gas-Elektroden diffundiert das Gas durch die Diffusionsmembran, bis der jeweilige Partialdruck im Medium und im Elektrolytfilm identisch ist. Im Fall der CO_2-Elektrode besteht der Elektrolyt aus Natrium-Bicarbonat und Natrium-Chlorid. Die NaCl-Konzentration legt die Spannung der Bezugselektrode fest. Der pH-Wert dieses Elektrolyten wird durch das Puffersystem Bicarbonat/CO_2 bestimmt. Die Gleichgewichtskonstante lautet:

$$K = \frac{({}^aHCO_3^-) \cdot ({}^aH^+)}{({}^aCO_2)_E} \quad ; \quad {}^aH^+ = K \frac{({}^aCO_2)_E}{({}^aHCO_3^-)}$$

$({}^aCO_2)_E$ = CO_2-Aktivität im Elektrolytfilm.

Es besteht daher ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Spannung der pH-Elektrode und der CO_2-Aktivität im Elektrolytfilm, die mit derjenigen in der Meßlösung $({}^aCO_2)_M$ identisch ist.

$$E = E_o + S \log ({}^aCO_2)_M$$

E = Spannung der kombinierten pH-Elektrode
E_o = Konstante
S = Steilheit

Der Gastransport durch die Membranfolie ist diffusionskontrolliert. Treibende Kraft für die Gasdiffusion ist der Gradient des Partialdruckes. Die Elektrode zeigt demnach, wenn

sie in Meßlösung getaucht wird, unterschiedliche CO_2-Partialdrücke in den Meßlösungen an. Der Zusammenhang zwischen dem Partialdruck eines Gases und der Konzentration der physikalisch gelösten Stoffmenge wird durch das Henry'sche Gesetz (vgl. IV.2.1.1.) beschrieben. Danach ist die spezifische Löslichkeit etwas von der Zusammensetzung der Lösung abhängig. Da man bei der Elektrodeneichung dieses Lösungsgleichgewicht miterfaßt, sollten sich Meß- und Eichlösung ähneln.

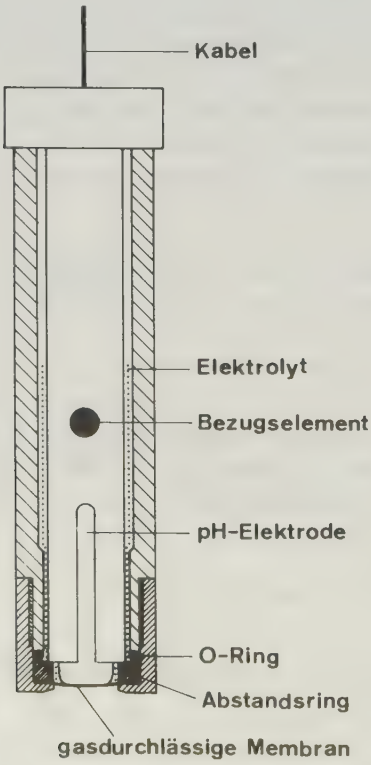


Abb. 55: Aufbau einer CO_2-Elektrode (78)

Gemäß dem Prinzip dieser Elektrode ergibt sich auch ein Wasserdampftransport durch die Membran, wenn der osmotische Druck zwischen Innen- und Außenlösung unterschiedlich ist. Dies kann die Konzentration der Innenlösung verändern und zu einem Driften der Elektrode führen (30).
Während die CO_2-Elektorde schon längere Zeit zur klinischen p_{CO_2}-Messung dient, konnte sie wegen der Nichtdampfsterilisierbarkeit und der starken Drift in der Fermentation nicht eingesetzt werden. Durch den Einbau in eine Wechselsonde (vgl. III.3), in der sie kalt sterilisiert und öfters nachgeeicht oder regeneriert werden kann, könnte sie vielleicht ein neues Anwendungsgebiet finden. Noch fehlen zur Zeit jedoch derartige Untersuchungen.

9.3.3. Paramagnetische O_2-Messung

Sauerstoff ist das am stärksten paramagnetische Gas, wodurch es sich von fast allen anderen Gasen unterscheidet. Lediglich einige als Betriebsgas seltene Stick- und Chloroxide (NO, NO_2, ClO_2, ClO_3) sind noch in geringem Maße paramagnetisch. Alle anderen Gase hingegen sind schwach diamagnetisch und treten bei einem auf dem Paramagnetismus beruhenden Analysenverfahren praktisch nicht in Erscheinung.
Der Paramagnetismus der Gase ist - im Gegensatz zum Diamagnetismus - temperaturabhängig. Er ist umgekehrt proportional zur Temperatur. Diese Tatsache und die Eigenschaft paramagnetischer Stoffe, in einem inhomogenen Magnetfeld in Richtung wachsender Feldstärke gezogen zu werden, wird beim Analysengerät Magnos 2T (Hartmann & Braun AG, Frankfurt/Main) folgendermaßen zur O_2-Messung ausgenutzt:
Das Meßgas befindet sich in einem waagrecht gelagerten, dünnwandigen Glasröhrchen, in dessen Inneren durch einen kräftigen Dauermagneten ein starkes magnetisches Feld erzeugt wird. Enthält das Meßgas Sauerstoff, dann wird von diesem Magnetfeld eine Kraft ausgeübt, die das Gas zu dem Ort größ-

ter magnetischer Feldstärke zu ziehen versucht. An der Stelle des größten Feldgradienten, nämlich in der Nähe der Kante des Magnetpolschuhes, wird das Meßgas durch einen elektrisch geheizten Draht, der um das Glasröhrchen gewunden ist, erwärmt. Infolge dieser Erwärmung nimmt der Paramagnetismus ab, d.h. die Anziehungskraft, die auf den erwärmten Teil des Gases ausgeübt wird, ist schwächer als diejenige, die auf die noch kalte Umgebung wirkt. Das Magnetfeld versucht also, vor allem das kalte Gas zu der Stelle der größten Magnetfeldstärke zu ziehen, so daß das von der Heizwicklung erwärmte Gas aus dem Feld und damit aus dem Meßröhrchen herausgedrückt wird. Da das nachströmende kältere Gas von der Heizwicklung fortlaufend erwärmt wird, bildet sich in dem Meßröhrchen eine stetige Strömung aus, die man als magnetischen Wind bezeichnet und deren Geschwindigkeit dem Sauerstoffgehalt des Meßgases etwa proportional ist. Der thermomagnetische Sauerstoffanalysator kann daher zur kontinuierlichen O_2-Analyse eingesetzt werden.
Der magnetische Wind (vgl. Abb. 56), der sich zwischen den durch N und S gekennzeichneten Polschuhen des Magneten aus-

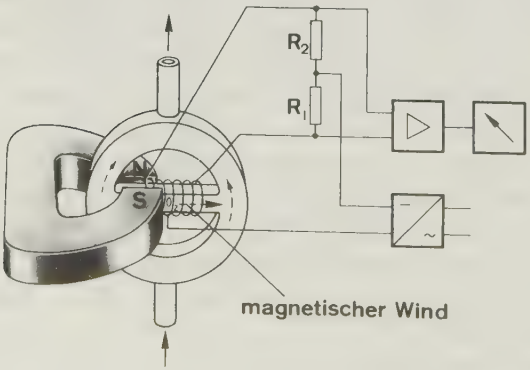


Abb. 56: Schematische Darstellung der Ringkammer

bildet, ist durch Pfeile angedeutet. Das Meßverfahren wird dadurch besonders einfach, daß man die Heizwicklung gleichzeitig zur Messung der Strömungsgeschwindigkeit benutzt. Aus diesem Grunde ist die Heizwicklung aus einem Material hergestellt, dessen Ohmscher Widerstand stark temperaturabhängig ist. Durch den magnetischen Wind entsteht eine - allerdings geringe - einseitige Abkühlung der in der Mitte angezapften Heizwicklung, was eine Widerstandsänderung ihrer im Magnetfeld liegenden Hälfte zur Folge hat. Somit ist die Größe des Widerstandverhältnisses der beiden Heizdrahthälften mit der Stärke des magnetischen Windes veränderlich. Durch zwei temperaturunabhängige Widerstände (R_1 und R_2) wird die Heizwicklung zu einer Wheatstone-Brücke ergänzt. Die durch die Widerstandsänderung verursachte Verstimmung der Wheatstoneschen Brücke erzeugt eine Brückendiagonalspannung, die dem nachgeschalteten Verstärker als Meßspannung zugeleitet wird.

Der Hohlring der Ringkammer besteht aus V4A-Stahl und erlaubt somit auch einen Einsatz bei korrosiven Gasen. Das Meßröhrchen ist genau symmetrisch zum Gaseingang bzw. Gasausgang in den Hohlring eingekittet und liegt waagrecht, so daß bei Abwesenheit von Sauerstoff innerhalb des Meßröhrchens keine Strömung entsteht. Ist das Röhrchen gegen die Horizontale geneigt, so bildet sich eine Konvektionsströmung darin aus, die, je nach welcher Seite es geneigt ist, dem magnetischen Wind gleich- oder entgegengerichtet ist. Den Auftrieb nutzt man nun zur Nullpunktunterdrückung aus. Das Röhrchen wird schräg gestellt, so daß magnetischer Wind und Konvektionsströmung entgegengerichtet sind. Das Magnetfeld ist so groß, daß der magnetische Wind bei 21 Vol.% O_2 den Auftrieb kompensiert.

Änderungen der Konzentration der Meßkomponente bei konstanter Begleitgaskonzentration ergeben nicht sofort den neuen Anzeigewert. Es vergeht eine kurze Zeitspanne, die sogenannte Totzeit T_t, bis sich die Ausgangsspannung am Analysator ändert; der Übergang zum neuen Anzeigewert erfolgt allmählich. Die Verzögerungszeiten (z.B. Totzeit, Halbwertzeit,

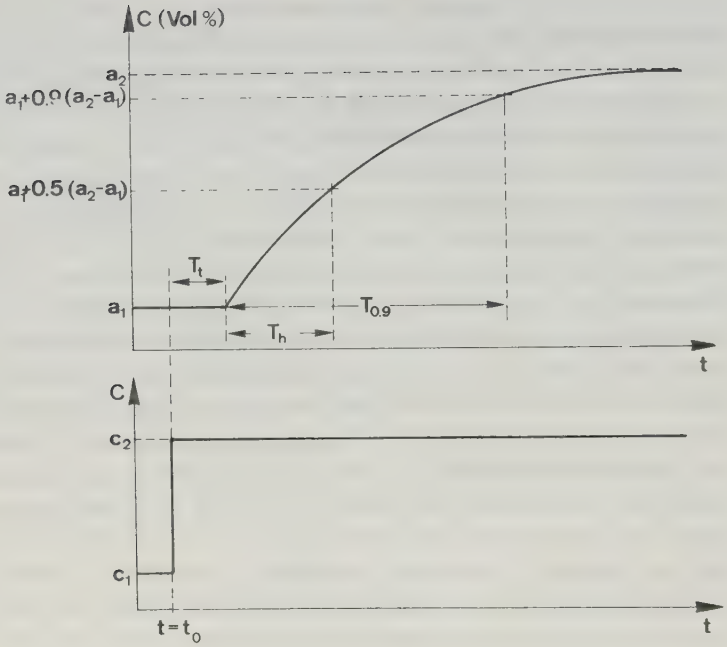


Abb. 57: Änderung der Anzeige bei sprungartiger Konzentrationsänderung

T_t Totzeit (ca. 4 sec; Minimalwerte bei 60 l/h)

T_h Halbwertzeit

$T_{0.9}$ 90-%-Zeit, d.h. die Zeit, die von Beginn der Anzeigeänderung vergeht, bis neue Einstellung 90 % von $a_2 - a_1$ beträgt (ca.30 sec).

90-%-Zeit) sind von Meßaufgabe und Gasdurchfluß abhängig. Sie werden durch vorgeschaltete Volumina vergrößert. Es ist daher anzustreben, die Dimensionen der Zuleitung so klein wie möglich zu halten, insbesondere bei Geräten, die zu Regelzwecken dienen.

Die temperaturempfindliche Meßkammer wird im Analysatorgehäuse durch einen Gehäusethermostaten auf einem konstanten

Temperaturwert von ca. o54° C gehalten. Der Gesamttemperaturfehler des Magnos 2T innerhalb des zulässigen Betriebstemperaturbereiches von o5 bis o45° C beträgt bei ruhender Luft ≤ 1 % der Meßspanne pro 10° C Umgebungstemperaturänderung. Durch eine entsprechende Gestaltung der Meßgaszuführung im Analysatorgehäuse erfolgt eine Angleichung der Gastemperatur auf die Thermostatentemperatur.
Das Meßergebnis ist wegen der Symmetrie der Ringkammer innerhalb der angegebenen Toleranzen (normal ca. 30 ... 60 1/h) weitgehend unabhängig von der eingestellten Durchflußmenge. Eine Eingrenzung der Strömungsabhängigkeit erfolgt bei der Eichung durch Justierungen in der Zuleitung zur Meßkammer.

Die thermomagnetischen Vorgänge in der Ringkammer hängen von der Gasdichte und damit vom Luftdruck des Meßortes ab. Schwankungen des atmosphärischen Druckes von ± 1 % ergeben eine Änderung des angezeigten Sauerstoffwertes von etwa ± 2 % des jeweiligen Sollwertes. Hingegen sind der Nullpunkt der Anzeige (0 % O_2) bzw. der Kompensationspunkt (21 % O_2) luftdruckunabhängig. Die Auswirkungen der witterungsbedingten augenblicklichen Schwankungen des örtlichen Luftdruckes auf die Messung können im allgemeinen vernachlässigt werden, dagegen muß die merkbare Änderung des mittleren Luftdruckes mit der Ortshöhe bei der Inbetriebnahme des Gerätes berücksichtigt werden. Diese letztgenannten Luftdruckänderungen können mit Hilfe der Empfindlichkeitseinstellung auf der Typenkarte am Aufstellungsort ausgeglichen werden.
Die Probeentnahme des Meßgases erfolgt hinter dem Abluftfilter. Da der Überdruck des Gases an dieser Stelle infolge des geringen Strömungswiderstandes der Abluftleitung relativ gering ist, wird das Meßgas von einer Membranpumpe angesaugt und durch den Meßgaskühler, das Membranfilter und die Analysengeräte gedrückt (vgl. Abb. 59). Der Meßgaskühler ist notwendig, um die unterschiedliche Feuchte, die das Meßergebnis verfälschen würde, auf einen genau definierten Wert (Taupunkt +2° C) einzustellen. Der Grad der Restfeuchtigkeit ist von untergeordneter Bedeutung, wenn er konstant gehalten wird. Das Membranfilter dient zum Schutz der Ana-

lysengeräte vor Staubpartikeln.
Wenn auch der Meßeffekt in erster Linie durch den Paramagnetismus des Sauerstoffes bedingt ist, spielen doch die anderen Eigenschaften (Zähigkeit, spezifische Wärme, Dichte) und somit die Zusammensetzung des Meßgases eine wesentliche Rolle. Sie wirken sich in einer Änderung der Empfindlichkeit des Gerätes aus.
Die Anzeige ist dem Quotienten

$$\frac{\rho \cdot c_p}{\eta} = \frac{\text{Dichte} \cdot \text{spez. Wärme}}{\text{Zähigkeit}}$$

etwa proportional.
Bei der Eichung muß eine ungefähre Analyse des Meßgases zugrunde gelegt werden. Das Ausgangssignal des Magnos 2T ist geringfügig CO_2-abhängig. Es wird deshalb in einer Korrekturschaltung vom Uras-Signal berichtigt. Danach wird das Millivolt-Signal in einem Meßumformer in einen linearisierten eingeprägten Strom von 0...20 mA umgesetzt.
Der Meßbereich des Analysengerätes liegt üblicherweise bei 21...18 Vol.% O_2. Er kann jedoch - je nach Meßaufgabe - durch Auswechseln der Typenkarte verändert werden.
Die Genauigkeit des Magnos 2T beträgt $\pm$ 2 % vom Endwert. Voraussetzung ist jedoch, daß es einmal pro Woche neu kalibriert wird.

9.3.4. Infrarot-Messung von CO_2

Der Meßeffekt des Analysengerätes (Uras 2T, Hartmann & Braun AG, Frankfurt/Main) beruht auf der spezifischen Strahlungsabsorption heteroatomiger Gase im Spektralbereich des mittleren Infrarot zwischen 2.5 µm und 12 µm Wellenlänge.
Jedes Gas, außer den einatomigen Edelgasen und den symmetrischen Gasen wie N_2, O_2, H_2 etc., besitzt ein aus mehr oder weniger Absorptionsbanden bestehendes und für das betreffen-

de Gas spezifisches Absorptionsspektrum. Die Absorption der Infrarotstrahlung findet in einer mit infrarotdurchlässigen Fenstern versehenen Küvette statt. Quantitativ wird die Absorption durch das Lambert-Beer'sche Absorptionsgesetz wiedergegeben. Danach ist die aus der Küvette austretende Strahlung I_1 der eintretenden Strahlung I_o proportional:

$$I_1 = I_o \cdot e^{-\varepsilon(\lambda)\rho \cdot 1}$$

Der absorbierende Anteil der Strahlung hängt also von der Dichte ρ des absorbierenden Gases, der Meßküvettenlänge 1 (genauer: optische Weglänge) und einem spezifischen Wert, dem Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda)$ ab, wobei λ die Wellenlänge ist. In einer Küvette von der Länge 1 beträgt die Absorption:

$$A(\lambda) = \frac{I_o - I_1}{I_o} = 1 - e^{-\varepsilon(\lambda)\rho \cdot 1}$$

Die Kalibrierung des Uras 2T erfolgt im allgemeinen in Volumenprozenten. Zwischen der Dichte des absorbierenden Gases und seiner Volumenkonzentration c besteht die Beziehung:

$$\rho = c \cdot \rho_o \frac{p}{p_o} \cdot \frac{T}{T_o}$$

Hierbei sind:

ρ_o = Dichte des reinen Gases
p_o = Druck (bei Normalbedingungen 1 bar, 0^o C)
T_o = Temperatur

Wie aus der Formel für die Absorption hervorgeht, ist die in Volumenkonzentrationswerten kalibrierte Anzeige vom Druck p und der Temperatur T des Gases abhängig. Der Einfluß dieser Größen auf das Meßergebnis muß also ausgeschaltet werden.

Der Infrarot-Gasanalysator Uras 2T ist ein Gerät zur kontinuierlichen Messung der CO_2-Konzentration. Zur Messung der Absorption wird ein nichtdispersives Verfahren angewendet, d.h. es findet keine spektrale Zerlegung der Infrarot-Strahlung statt. Stattdessen wird die Absorption in einer Wechsellicht-Photometer-Anordnung mit zwei parallelen Strahlengängen und einem selektiv wirkenden Strahlungsempfänger gemessen. Das Meßgas wird durch die im Meßstrahlengang liegende Analysenkammer geleitet. In der Vergleichskammer im zweiten Strahlengang befindet sich Stickstoff, der keine Strahlung absorbiert. Die von zwei elektrisch hintereinandergeschalteten Glühwendeln ausgehende Strahlung fällt nach Durchlaufen der Analysen- bzw. Vergleichskammer in die beiden Empfängerkammern. Diese sind mit der zu messenden Gaskomponente (CO_2) gefüllt und durch eine gespannte Metallmembran voneinander getrennt. Die einfallende Strahlung wird nur in den spezifischen Absorptionsbanden des Empfängergases, also selektiv, absorbiert. Durch Molekülzusammenstöße erfolgt momentan eine Umwandlung der absorbierten Energie in Wärmeenergie. Eine Differenz der absorbierten Energie, die wegen der Selektivität des Empfängers nur von der Konzentration der Meßkomponente in der Meßküvette abhängt, führt damit zu einem Temperatur- und Druckunterschied zwischen den beiden Empfängerkammern. Die Druckdifferenz bewirkt ein Durchbiegen der Membran und damit eine Kapazitätsänderung des aus der Membran und einer Gegenelektrode bestehenden Membrankondensators. Da die Strahlung durch ein umlaufendes Blendenrad periodisch und gleichphasig in beiden Strahlengängen unterbrochen wird, treten auch die Druck- und Kapazitätsschwankungen periodisch auf. Der Membrankondensator liegt über einem hochohmigen Widerstand an einer Gleichspannungsquelle. Die Kapazitätsschwingungen verursachen einen periodischen Ladestrom, der über dem Hochohmwiderstand eine Wechselspannung im mV-Bereich erzeugt. Diese Spannung wird verstärkt und gleichgerichtet. Der Verstärker liefert als Ausgangssignal einen eingeprägten Gleichstrom von 0...20 mA.

Zwischen dem Auftreten einer Konzentrationsänderung am Meßgas-Eingang und der Anzeige dieser Konzentrationsänderung besteht eine zeitliche Verzögerung, die durch Angabe der sogenannten 90-%-Zeit ausgedrückt wird. Die Anzeigeverzögerung wird zum einen verursacht durch die Einstellzeit T_E des Verstärkers und zum anderen durch die Zeit, die bis zum Füllen der Analysenkammer benötigt wird. Diese ist wiederum abhängig von dem Volumen des Zuführungsschlauches V_S, dem Volumen der Analysenkammer V_K und dem Durchfluß Q des Gases. $T_{0.9}$ läßt sich nach der Formel

$$T_{0.9} \approx T_E + \frac{V_S + 1/2\ V_K}{Q}$$

berechnen.

$T_{0.9} = f\ (T_E)$: ca. 1.5 sec
$T_{0.9} = f\ (1/2\ V_K)$: ca. 4-6 sec (30 1/h)
$T_{0.9} = f\ (V_S)$: richtet sich nach den Schlauchabmessungen

Die Probeentnahme des Meßgases und dessen Aufbereitung erfolgt in gleicher Weise wie es unter III.9.3.3. beschrieben wurde.
Unter Normalbedingungen (1 bar, 0° C) entspricht einer Luftdruckänderung von 13.3 mbar (10 Torr) eine scheinbare Konzentrationsänderung von 1.3 % des Meßwertes, einer Temperaturänderung von 1° C in der Meßküvette entspricht eine scheinbare Konzentrationsänderung von 0.3 % des Meßwertes. Läßt man diese Fehler außer Betracht, so bleiben die gerätetechnisch bedingten Empfindlichkeitsänderungen normalerweise unter 2 % vom Ausschlag pro Woche (Angaben des Herstellers).
Mit dem Uras 2T ist indes keine absolute Konzentrationsmessung möglich. Dies bedeutet, daß vor Beginn der Messung und in gewissen Zeitabständen der Nullpunkt und die Empfindlichkeit mit geeigneten Vergleichsstandards kontrolliert werden

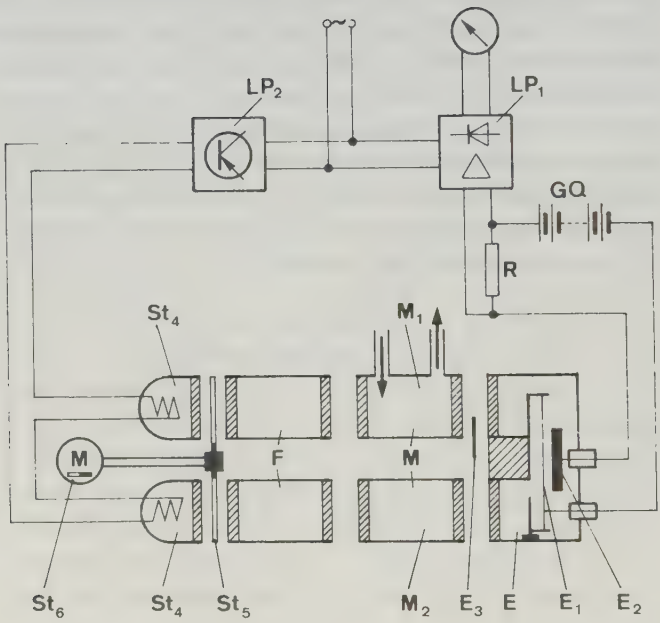


Abb. 58: Prinzipschema des Infrarot-Gasanalysators Uras 2T (Hartmann & Braun AG, Frankfurt/Main)

E	Empfänger	M	Meßküvette
E1	Membran	M1	Analysenkammer
E2	Gegenelektrode	M2	Vergleichskammer
E3	Empfängerblende	R	Hochohmwiderstand
F	Filterküvette	St4	Strahlungsquelle
GQ	Gleichspannungsquelle	St5	Blendenrad
LP1	Verstärker	St6	Blendenradmotor
LP2	Netzstabilisierung		

Die Innentemperatur des 19"-Einschubes wird mittels eines Heizlüfters konstant gehalten. Der Thermostat schaltet bei Über- oder Unterschreiten der Solltemperatur von ca. 60° C aus bzw. ein.

müssen. Als Vergleichsstandards dienen analysierte Gasgemische (Eichgase), die nur mit einer begrenzten Genauigkeit hergestellt werden können. Damit ist die absolute Meßgenauigkeit des Gerätes durch die Analysengenauigkeit der Prüfgase bestimmt.

Der Meßbereich liegt normalerweise bei 0...3 Vol.% CO_2.

Ein fahrbarer 19"-Normschrank enthält die Geräte zur CO_2- (Uras 2T) und O_2-Messung (Magnos 2T) und deren Registrierung, sowie die Geräte zur Meßgasförderung (Membranpumpen) und Meßgasaufbereitung (Filter, Meßgaskühler) und dient der Überwachung zweier Meßstellen, wobei es gleichgültig ist, ob dies die Ausgänge zweier Fermenter sind,oder ob es ein Eingang und ein Ausgang eines Fermenters ist (vgl. Abb. 59).

Die Umschaltung der Gaswege von den einzelnen Meßstellen erfolgt mit Magnetventilen. Diese werden über ein Tastenfeld im Programmschaltwerk-Einschub betätigt. Die Taste "Nullgas" gestattet die Aufschaltung von Frischluft zur Nullpunkteinstellung der Analysengeräte, die Taste "Prüfgas" die Aufschaltung von Prüfgas auf die Analysengeräte zur Endpunkt-Einstellung. Die Taste "Messen" schaltet das Programmschaltwerk ein, das alle 90 s von einer Meßstelle auf die andere (Fermenter 1 und 2) umschaltet, d.h. für jede Meßstelle tritt nach einer Meßzeit von 90 s eine Pause von 90 s ein. Diese Pause kann ohne weiteres hingenommen werden, da sich die Gasvorgänge in den Fermentern relativ langsam ändern. Während die eine Meßstelle auf die Analysengeräte geschaltet ist, wird die andere im Nebenfluß gespült, so daß beim Umschalten immer frisches Meßgas zur Verfügung steht. Das Programmschaltwerk besitzt überdies einen Synchronisations-Kontakt für den Schreiber, damit Schreiber und Meßstellenumschaltung einander zugeordnet werden können.

Die Förderung des Gases in den Meßleitungen geschieht durch Membranpumpen (Typ 2, Hartmann & Braun AG, Frankfurt/Main), die in der Steuer-Einheit untergebracht sind.

Der Meßgaskühler ist im unteren Teil des Schrankes eingebaut und schrankintern den Gasanalysengeräten vorgeschaltet. Die Kondensat-Ablaßhahnen der beiden Kondensatauffangbehäl-

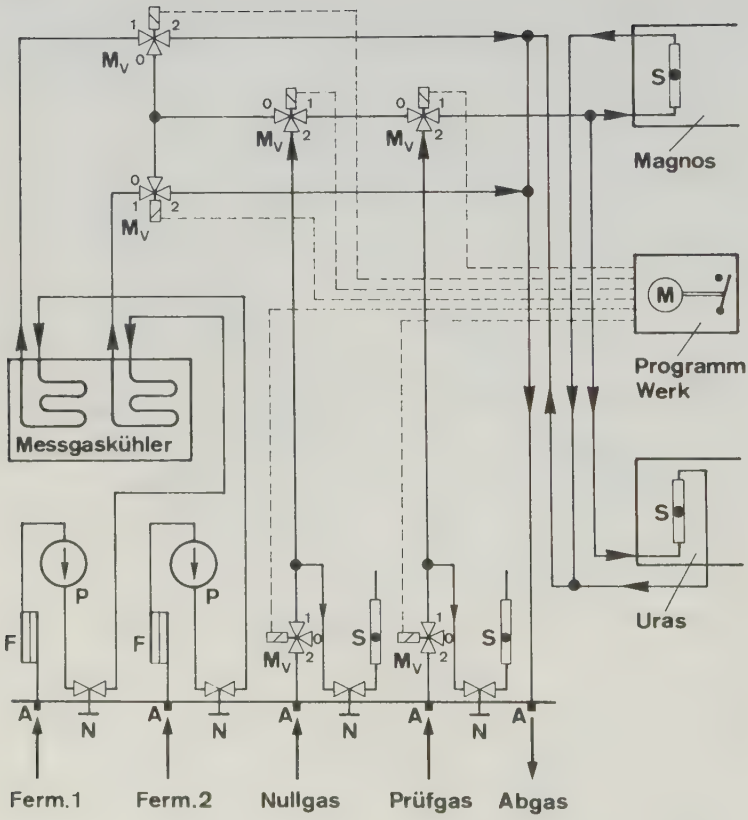


Abb. 59: Pneumatischer Schaltplan zur O_2- und CO_2-Meßwerterfassung.
A, Schlauch-Anschlußtüllen; F, Membranfilter; M, Motor des Programmschaltwerkes; M_V Magnetventile (1-2 erregt/1-0 unerregt); N, Nadelventile; P, Membranpumpen; S, Strömungsmesser

ter befinden sich auf der Frontseite ganz unten.
Die 2 Rundsteckdosen in der Steuer-Einheit sind für den Anschluß der Meßwertkabel der Durchflußmessung vorgesehen.
Die Registrier-Einheit besteht aus einem Polycomp 2 Kompensations-Punktschreiber mit 6 Meßstellen, die folgendermaßen belegt sind:

Fermenter 1:	Meßstelle 1	21...18 Vol.% O_2
	Meßstelle 2	0... 3 Vol.% CO_2
	Meßstelle 3	0...2000 l/h (1013 mbar, 0° C)
Fermenter 2:	Meßstelle 4	21...18 Vol.% O_2
	Meßstelle 5	0... 3 Vol.% CO_2
	Meßstelle 6	0...2000 l/h (1013 mbar, 0° C)

Die Anlage wurde inzwischen durch einen externen Meßstellenumschalter für die Anschlüsse von 4 Fermentereinheiten erweitert.

9.3.5. Gaschromatographie-Analysensystem

Die Prozeß-Gas-Chromatographen Modelle PGC 10 bzw. PGC 20 der Firma Dr. Ing. H. Feichtinger, Schaffhausen/Schweiz, sind in ihrer Gesamtkonzeption speziell für die Bestimmung von Permanentgasen zugeschnitten und haben sich in der Praxis zur Analyse von Fermenter-Abluft (O_2, CO_2) bereits bewährt (43).
Von dem zu analysierenden Luftstrom 1 (Abluft, Tubing-System) wird mit einer Förderpumpe 3, z.B. einer Schlauchpumpe, ein Gasstrom 2 von z.B. 30 ml/Min. abgeleitet (vgl. Abb. 60). Mit dem Gasprobenahmeventil 4 werden dieser Nebenströmung zwei definierte Gasproben simultan entnommen und mit Helium als Trägergas weitertransportiert. Über die Verbindungsleitung 5 sowie die Absorptionsröhren 6 (Wasserabsorption) und 7 (CO_2-Absorption) gelangt die Gasprobe in die Trennsäule 11a des Gaschromatographen. Dieses Molekularsieb ist in der Lage, neben Sauerstoff und Stickstoff auch Was-

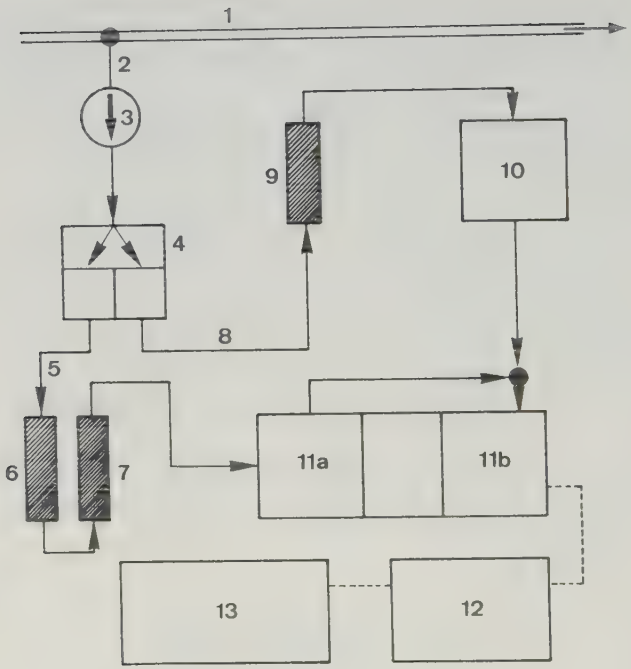


Abb. 60: Fluß-Schema eines Prozeß-Gas-Chromatographen für die Permanentgas-Bestimmung von O_2 und CO_2 (Dr. Ing. H. Feichtinger, Schaffhausen/Schweiz). 1, Abluftstrom; 2, Teil-Gasstrom; 3, Schlauchpumpe; 4, Gasprobenahmeventil; 5, Teilstrom für O_2-Analyse; 6, Wasserabsorption; 7, CO_2-Absorption; 8, Teilstrom für CO_2-Analyse; 9, Wasserabsorption; 10, separater Säulenheizofen; 11a, Trennsäule; 11b, Wärmeleitfähigkeits-Dedektor; 12, Spitzenwertgeber (oder Integrator); 13, Kompensationsschreiber.

serstoff, Methan und Kohlenmonoxyd zu bestimmen. Die zweite Probe gelangt mit der Teilströmung 8 über die Wasserabsorption 9 in den separaten Säulenheizofen 10, welcher auf eine für die CO_2-Bestimmung günstige Temperatur gesetzt ist. Beide Proben gelangen anschließend in den Wärmeleitfähigkeits-

Dedektor 11b. Die dort erzeugten Signale können mit einem Spitzenwertgeber oder einem Integrator 12, sowie einem Kompensationsschreiber 13 registriert werden. Da die Peaks sehr schmal sind, genügt zu deren Auswertung ein Spitzenwertgeber.
Dieses Analysensystem zeichnet sich aus durch hohe Genauigkeit, relativ geringe Anschaffungskosten und Bedienungsfreundlichkeit. Zur näheren Beschreibung sind folgende technische Daten aufgeführt:

- selbsttätige Umstellung der Empfindlichkeit auf vorwählbare Faktoren: PGC 10 gestattet zwei Umstellungen
  PGC 20 deren drei
- Über Zeitprogramm geregelte Ausheizung und Zurückschaltung auf Arbeitstemperatur der Säulen
- Einwandfreie Nullinie: exakte Thermostatisierung der Säulen
  separate Thermostatisierung des Dedektors
  exakte Strömungsregulierung
- Kurze Analysenzeit (max. 90 sec) und gute Trennung der Peaks
- Spitzenwertgeber Modell 77/7/1: Empfindlichkeit 1 Mikrovolt/Digit
  Bereich 0...39.999 Millivolt
- Das Gaseinschleusventil wird über eine Zeituhr gesteuert, die eine periodische Einschleusung im Bereich von einigen Minuten bis zu mehreren Stunden gestattet.

9.3.6. Massenspektrometer

Das Massenspektrometer stellt in seiner Art ein einmaliges Instrument dar, da es Gasgemische sowohl qualitativ wie quantitativ analysiert. Das Gerät arbeitet kontinuierlich, mit sehr kurzer Ansprechzeit und sehr kleinen Probenvolumina.

Das Quadrupol-Massenspektrometer (vgl. Abb. 61) arbeitet nach dem Prinzip der Massentrennung durch Schwingungen der

Ionen in einem hochfrequenten Quadrupolfeld. Ein Elektronenstoß ionisiert die Atome oder Moleküle eines zu untersuchenden Gases. Die so gebildeten Ionen werden beschleunigt und gelangen durch das Stabsystem auf den Faradayauffänger oder den Sekundärionenvervielfacher. Der dem Partialdruck proportionale Auffängerstrom wird über den Elektrometerverstärker gemessen. Die Vorteile des Quadrupol-Massenspektrometers gegenüber anderen Typen sind in der Arbeit von NOBBS (75) ausführlich beschrieben.

Die eigentliche Trennung der Massen geschieht im Stabsystem. Von den 4 Stäben sind je zwei gegenüberliegende miteinander elektrisch verbunden. An diese beiden Stabpaare wird eine Spannung $U + V \cos \omega t$ angelegt. Die spezifische Masse m/e der Ionen, die am Ausgang des Analysatorsystems nachgewiesen werden kann, ist der HF-Amplitude V proportional. Beim Massendurchlauf (kontinuierliche Änderung der Amplitude V) wird das Verhältnis der Gleichspannungsamplitude U und der Wechselspannungsamplitude V konstant gehalten. Entsprechend der gewählten Spannung U und V können nur Ionen einer bestimmten Massenzahl m/e das Quadrupolfeld durchlaufen. Diese Ionen vollführen dabei stabile Schwingungen um die Systemachse. Alle Ionen mit anderer m/e werden dagegen zu immer stärker anwachsenden Schwingungen angeregt, bis sie mit einem der Stäbe kollidieren, dabei ihre Ladung abgeben und somit nicht auf den Auffänger gelangen.

Von den Parametern, die für die Massentrennung verantwortlich sind, werden aus technischen Gründen der Radius des Quadrupolfeldes und die Frequenz festgesetzt. Variabel bleiben die Hf-Spannung V (Massendurchlauf) und das Verhältnis U/V (Einstellung der Auflösung).

Der Analysator, der im Hochvakuum (10^{-4} Torr) arbeitet, benötigt für die Analysen extrem kleine Gasmengen, die über spezielle Gaseinlaß-Systeme in den Meßrezipienten gelangen.

Das Gaseinlaß-Ventil, das in Abb. 62 dargestellt ist, ermöglicht durch ein zweistufiges Druckreduziersystem den Druck eines Gasgemisches von hohem Druck, z.B. Atmosphärendruck, bis in den Bereich von 10^{-4} Torr zu drosseln. Bei

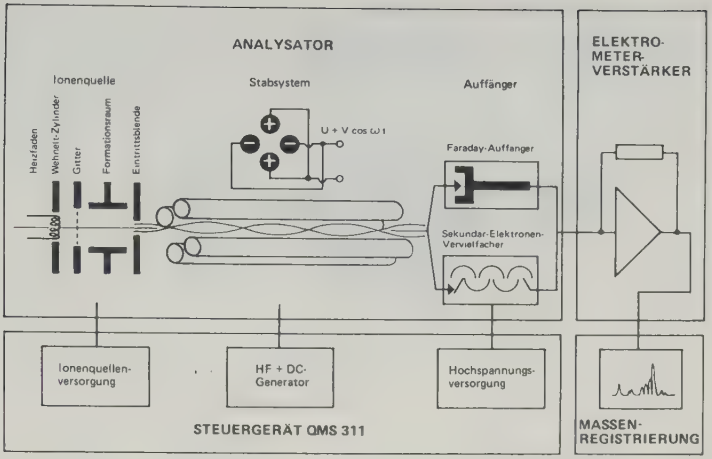


Abb. 61: Schematischer Aufbau eines Quadrupol-Massenspektrometer-Systems (Balzers Hochvakuum GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt)

dieser Druckreduktion bleibt die Partialdruckzusammensetzung des Gasgemisches erhalten.
Durch eine geeignet dimensionierte Kapillare (A) wird das zu untersuchende Gasgemisch kontinuierlich und laminar von der Hochdruckseite in den Ventilkörper eingelassen. Auf der anderen Seite (C) wird es durch eine Vorvakuumpumpe wieder laminar abgepumpt. Ein kleiner Teil der Gase strömt durch ein Leck molekular (Poralkörper aus rostfreiem Stahl) in den Hochvakuumrezipienten (D) ein. Da das Gas aus dem Rezipienten ebenfalls molekular abgepumpt wird, findet trotz der massenabhängigen Molekularströmung keine Entmischung statt. Partialdruckänderungen im Hochvakuum-Rezipienten sind daher proportional den Partialdruckänderungen eines Gasgemisches am Eingang der Kapillare.
Durch das Heizen der Kapillare und des Ventilkörpers (B) können Kondensationseffekte während des Gaseinlasses weitgehend vermieden werden.

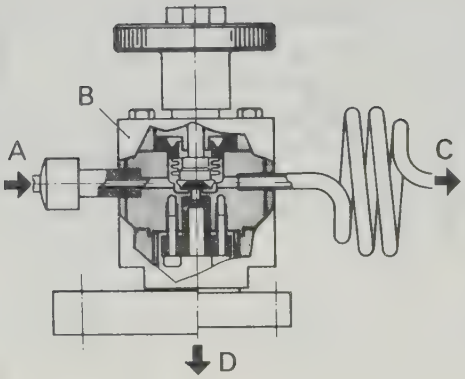


Abb. 62: Gaseinlaß-System GES 010 (Balzers Hochvakuum GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt)
A, Kapillare; B, Ventilkörper; C, zur Vorvakuumpumpe; D, zum Hochvakuumrezipienten.

Die Messung von gelösten Gasen erfordert ein modifiziertes Einlaß-System. Im Prinzip wird der Poralkörper durch eine semipermeable Membran ersetzt. Diese trennt den Druck innerhalb des Fermenters vom Hochvakuum des Meßrezipienten, erlaubt aber niedermolekularen Komponenten - wie gelösten Gasen und flüchtigen Substanzen - den Durchgang in den Analysator.
Im Jahre 1963 wurde ein solches Einlaß-System erstmals von HOCH et al. (54) beschrieben, später folgten noch weitere Autoren (66, 104). WOLDRING et al. (115) veröffentlichte ein System, das aus einer membranbestückten Kanüle besteht und in der klinischen Forschung für die direkte Messung der Blutgase im Blutkreislauf verwendet wird. REUSS et al. (90) stellten 1975 ein membranbestücktes Einlaß-System vor, das erstmals direkte Messungen in Fermentationsflüssigkeiten unter sterilen Bedingungen erlaubt.
Die Permeation eines Gases durch eine Membran umfaßt verschiedene physikalische Phänomene und ist letztlich eine Funktion der Löslichkeit, der Diffusion und der Wiederver-

dampfung des durchdringenden Gases. Die Gastransfer-Rate ist direkt proportional dem Druckgradienten in dieser Membran, ihrer Oberfläche und indirekt proportional ihrer Dicke. Die Gastransfer-Rate läßt sich somit folgendermaßen wiedergeben (54):

$$\text{Gastransfer-Rate} = \frac{D \cdot a \cdot \Delta p}{l} \cdot k = \frac{\overline{P} \cdot a \cdot \Delta p}{l}$$

wobei

$\overline{P}$ = Permeabilitätskonstante
a = Membranoberfläche
D = Diffusionskoeffizient
l = Membrandicke
k = Löslichkeitskonstante
Δp = Partialdruck-Differenz durch die Membran.

Der Wert von $\overline{P}$ ist abhängig vom jeweiligen Gas, vom Membranmaterial und von der Temperatur, d.h. der Logarithmus von $\overline{P}$ ist direkt proportional dem reziproken Wert der absoluten Temperatur (54). Die unterschiedlichen Permeationsraten der einzelnen Membranmaterialien für die verschiedenen Gase kann dazu ausgenützt werden, einzelne Komponenten, die für den Prozeß wichtig sind, gegenüber anderen, anzureichern. Die wichtigsten Teile des Einlaß-Systems sind: Membran, Membranunterlage, die ihr mechanische Festigkeit verleiht, und eine lecksichere Methode für die Befestigung der Membran. Da Membran samt Halterung im eingebauten Zustand mitsterilisiert werden, müssen alle Materialien temperaturbeständig sein. Das Einlaß-System ist über eine Stahlkapillare mit dem Quadrupol-Analysator verbunden. In Abb. 63 sind zwei Varianten schematisch dargestellt.
Ein Meßsystem, wie es von der Balzers Hochvakuum GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, für die Blutgasanalyse entwickelt wurde, ist in Abb. 64 dargestellt. Vorversuche damit wurden am Institut durchgeführt und fielen sehr positiv aus. Das Fernziel liegt in der gleichzeitigen Erfassung folgender Para-

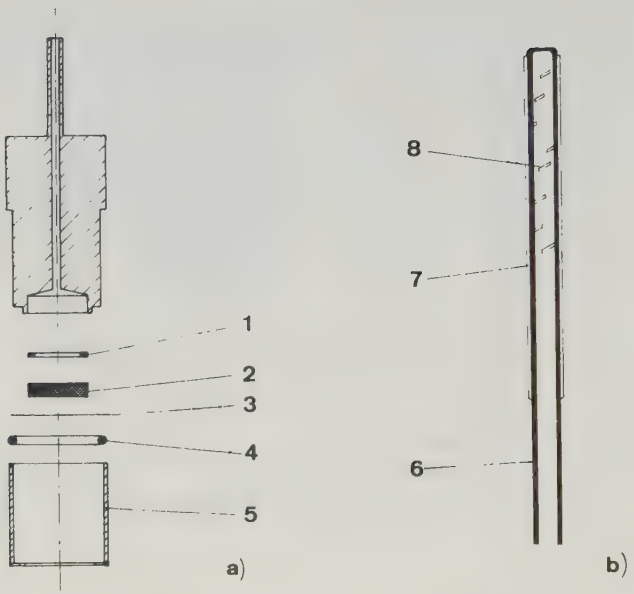


Abb. 63: Einlaß-Systeme für gelöste Gase und flüchtige Komponenten.
a) Flache Membran auf Glasfritte (90)
b) Membranbestückte Stahlkapillare mit seitlichen Einlaßöffnungen (9, 18, 19)
1, Distanz-Ring; 2, Glasfritte; 3, Siliconmembran; 4, O-Ring; 5, Muffe; 6, Stahlkapillare; 7, Siliconschlauch; 8, seitliche Einlaßöffnungen.

meter:

1. Über das Druckreduzier-Einlaßventil:
   - Zusammensetzung der Zuluft (O_2, CO_2)
   - Zusammensetzung der Abluft (O_2, CO_2, flüchtige Komponenten)
2. Über das membranbestückte Einlaß-System:
   - gelöstes O_2
   - gelöstes CO_2
   - gelöste flüchtige Komponenten (Methanol, Äthanol, Acetat, Methan ect.)

Mit Hilfe eines zeitgesteuerten Mehrwegventils sollte es möglich sein, die verschiedenen Einlaß-Systeme alternierend mit dem Hochvakuumrezipienten zu verbinden. Mit einem Peak-Prozessor und einem Mehrkanalschreiber lassen sich mehrere Komponenten gleichzeitig erfassen.

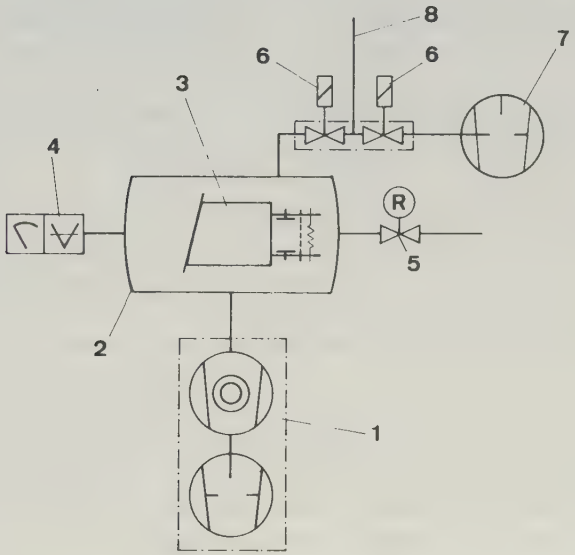


Abb. 64: Meßsystem für Blutgasanalysen
1, Hochvakuum-Pumpstand; 2, Meßrezipient; 3, Quadrupol-Analysator; 4, Vakuummeßzelle mit Anzeigegerät; 5, Eichgas-Einlaßventil; 6, Elektromagnetische Ventile; 7, Drehschiebervakuumpumpe; 8, Blutgassonde.

IV. BIOTECHNOLOGISCHE ASPEKTE

1. Sterilisation und Sterilhaltung

Alle Sterilhaltungsmaßnahmen bezwecken die Verhinderung einer Entwicklung von Fremdorganismen, die bei der Sterilisation abgetötet oder an ihrem nachträglichen Eindringen gehindert werden müssen. Unerwünschte Organismen können nicht nur durch undichte Stellen des Systems eintreten, sondern auch mit der Belüftungsluft, den Korrekturlösungen und bei einzelnen Manipulationen in die Kultur gelangen. Mikroorganismen können aus Flüssigkeiten durch mechanische Verfahren entfernt werden, so z.B. durch Filtration, Zentrifugation, Flotation oder elektrostatisch. Ebenso können sie abgetötet werden durch Wärme, chemische Wirkstoffe oder elektromagnetische Wellen. Obwohl Zellen durch mechanische Abrasion zerstört und abgetötet werden können, haben diese Methoden nur für die Laboranwendung Bedeutung erlangt und sind für industrielle Maßstäbe unbefriedigend. Das Gleiche gilt für X-Strahlen, ß-Strahlen, UV-Licht und Ultraschall.
Die Sterilfiltration kommt vor allem zur Anwendung für die Kaltsterilisation kleinerer Flüssigkeitsmengen wärmelabiler oder flüchtiger Substanzen. Die chemische Entkeimung mit flüssigen (107) oder gasförmigen (62) Agentien empfiehlt sich vornehmlich für hitzeempfindliche Geräteteile und Sensoren (III.3.). Werden damit Kulturmedien oder Bestandteile davon sterilisiert, stellt sich das Problem der Verträglichkeit der Restmengen mit der nachfolgenden Kultur.
Der Hitzesterilisation kommt sowohl bei kleinen wie bei großen Anlagen auch heute noch die größte Bedeutung zu (3, 35, 41, 101). Wichtig ist dabei die vollständige Entgasung des Fermenterinnenraumes und der Flüssigkeit sowie die keimfreie Belüftung nach der Erhitzung. Eine gänzliche Entgasung gelingt nur dann, wenn der Fermenterkessel keine Hohlräume aufweist, in denen sich Luftpolster halten können. Die Normstutzen sind daher in ihren Abmessungen so konzi-

piert, daß sich bei der Sterilisation in den durch den Membranverschluß abgeschlossenen Hohlräumen am Fermenterdeckel eine Konvektionsströmung bilden kann. Ebenso weist das Belüftungsrohr (vgl. Abb. 22) Entlüftungslöcher auf.
Der Rückflußkühler - ohne Kühlwasseranschluß - wird gemeinsam mit dem Fermenter sterilisiert. Das im Membranverschluß des Rückflußkühlers eingeschraubte Sicherheitsventil dient zugleich der Entlüftung des Fermenters. Zur sterilen Belüftung des Kesselinnenraumes beim Abkühlen wird beim Unterschreiten der Siedetemperatur der Abluftfilter steril an die Stelle des Sicherheitsventils aufgesetzt.

Die Hitzesterilisation der Kulturmedien weist trotz der offensichtlichen Einfachheit ihrer Anwendung einige Nachteile auf (62):

- Denaturierung von Proteinen
- Zerstörung von Vitaminen und Wuchsstoffen
- Bräunungsreaktionen

Letztere lassen sich in mehrere Kategorien unterteilen:

- Caramelisierung von Zuckern
- Oxydationen
- Polymerisation ungesättigter Aldehyde
- Maillard-Reaktion
- Hydrolyse von Di- und Polysacchariden, was zu einer Zunahme an reduzierenden Zuckern führt.

Es ist bekannt, daß sich Kohlehydrate bei der Erhitzung auf hohe Temperaturen zersetzen. Komplexe Dehydrationsreaktionen bilden mehr oder weniger stabile Zwischenprodukte, die weiter zu stark braunen Kondensations- oder Polymerisations-Produkten, bekannt als Melanoidine, reagieren können. Reduzierende Zucker, teilweise während der Erhitzung durch Hydrolyse entstanden, reagieren mit primären und sekundären Aminen (Aminosäuren, Peptide, Proteine). Die Schlüsselsubstanz dieser sogenannten Maillard-Reaktion ist die durch die Amadori-Umlagerung entstandene 1-Amino-2 Deoxy-2 Ketose, aus welcher durch Dehydrierung und Spaltung eine Vielzahl

von chemisch aktiven Substanzen entsteht, von der ein großer Teil den Strecker-Abbau der Aminosäuren einleitet. Bei letzterer wird NH_3 freigesetzt. Diese Bräunungsreaktionen sind stark pH-abhängig (1, 7, 15). Zudem wird die Maillard Reaktion durch verschiedene Anionen (z.B. in Pufferlösungen) katalysiert (15).

All diese Reaktionen bewirken nicht nur einen Verlust an verfügbaren Mediumsbestandteilen, vor allem an Wuchsstoffen (35), sondern viele Produkte der Maillard-Reaktion sind für Mikroorganismen toxisch (35, 62). Nach SOLOMONS (101) werden die meisten Fermentationen mehr oder weniger durch die "Qualität" der Nährlösung beeinflußt. Er mißt deshalb der Kontrolle der Qualität eines Substrates eine ebenso große Bedeutung zu wie der anderer Parameter.

Durch getrennte Sterilisation der C- und N-Quellen und ein Vermischen der Komponenten nach deren Abkühlung kann die Hitzeschädigung beachtlich reduziert werden. Eine solche Aufteilung läßt sich bei chemisch definierten Medien einfach durchführen, ist hingegen bei vielen komplexen Nährlösungen unmöglich.

Die oben erwähnten komplexen Reaktionen während der Hitzesterilisation werden bereits durch eine Aktivierungsenergie von 2 bis 20 kcal/g mol eingeleitet. Für die Abtötung von Mikroorganismen, d.h. vor allem deren Sporen, benötigt man eine Aktivierungsenergie in der Größenordnung von 50 bis 100 kcal/g mol (3, 34). Man ersieht daraus die Problematik, die sich bei der Sterilisation komplexer Medien stellt: Es sollten dabei Sicherheit der Sterilität, minimale Schädigung des Mediums und geringe Kosten - vor allem im industriellen Maßstab - in Einklang gebracht werden.

1.1. Abtötung von Mikroorganismen

Die Abtötung von Mikroorganismen folgt einer Reaktion erster Ordnung und kann durch die Formel

$$\frac{dN}{dt} = - kN \qquad (1)$$

ausgedrückt werden.

N = Zahl der lebenden Mikroorganismen
t = Zeit (Kontaktzeit)
k = Konstante der Reaktionsgeschwindigkeit

Gebräuchlicher für Kinetikberechnungen ist die integrierte Form obiger Gleichung. Wird diese integriert unter der Bedingung

$$N = N_o \text{ zur Zeit } t_o$$

erhält man

$$N = N_o \, e^{-kt} \qquad (2)$$

Unter der Dezimal-Reduktions-Zeit D versteht man die Hitzeeinwirkzeit, während welcher die Mikroorganismenpopulation auf 1/10 ihres Ausgangswertes reduziert wird.

Gemäß Definition von D:

$$\frac{N}{N_o} = \frac{1}{10} = e^{-kD}$$

erhält man

$$\ln 10 = \ln e^{kD} = kD$$

$$D = \frac{2.303}{k} \qquad (3)$$

Der Effekt der Temperatur auf die spezifische Reaktionsrate k kann durch die Gleichung von Arrhenius wiedergegeben werden:

$$k = \alpha' e^{-E/RT} \qquad (4)$$

α' = empirische Konstante
T = absolute Temperatur (^{o}K)
E = Aktivierungsenergie
R = Gaskonstante (1.98 cal/g mol ^{o}K)

Untersuchungen von AIBA et al. (3) zeigen eine lineare Korrelation zwischen der isothermalen Abtötungsrate k und dem reziproken Wert der absoluten Temperatur 1/T.
Das Sterilitätskriterium ∇_{total} ist eine Größe für den Sterilisationsgrad und resultiert aus der Integration der Gleichung (1)

$$\nabla_{total} = \ln \frac{N_o}{N} = \int_o^t k \, dt = \alpha' \int_o^t e^{-E/RT} \, dt$$

Die Lösung dieses Integrals führt zu einem brauchbaren Aus-

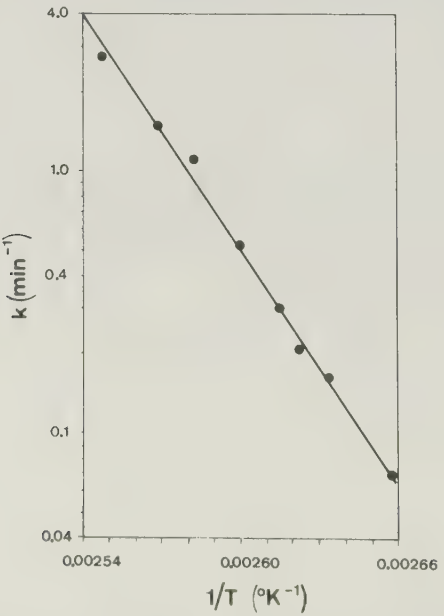


Abb. 65: Korrelation zwischen der isothermalen Abtötungsrate k für Bacillus stearothermophilus Fs 7954 und 1/T. Die Aktivierungsenergie E = 68.7 kcal/g mol.

druck für die Berechnung und die Vorhersage der Leistung einer Sterilisationseinheit. Eine Erschwerung besteht darin, daß k eine explizite Funktion von t ist, d.h. k ist, wie aus Gleichung (4) hervorgeht, eine Funktion der absoluten Temperatur und diese, durch den Wärmetransfer bedingt, eine der Zeit t.

Für Batch-Sterilisation empfiehlt sich daher eine graphische Integration der spezifischen Abtötungsrate entlang der Erhitzungskurve. Das Sterilitätskriterium gliedert sich auf in:

$$\nabla_{total} = \ln \frac{N_o}{N} = \nabla_{Heizen} + \nabla_{Sterilisieren} + \nabla_{Kühlen}$$

$$\nabla_{Heizen} = \ln \frac{N_o}{N_1} = \int_o^{t_1} k \, dt = \alpha' \int_o^{t_1} d^{-E/RT} \, dt$$

$$\nabla_{Sterilisieren} = \ln \frac{N_1}{N_2} = \int_o^{t_2} k \, dt = \alpha' \int_o^{t_2} e^{-E/RT} \, dt =$$

$$\alpha' e^{-E/RT} \, t_2$$

$$\nabla_{Kühlen} = \ln \frac{N_2}{N} = \int_o^{t_3} k \, dt = \alpha' \int_o^{t_3} e^{-E/RT} \, dt$$

$$t = t_1 + t_2 + t_3$$

N = Sterilitäts-Level (Anzahl der Kontaminanten nach der Sterilisation)

N_o = Kontaminations-Level (Anzahl der Kontaminanten im Rohmedium)

N_1 = Anzahl der Kontaminanten nach der Aufheizperiode t_1

N_2 = Anzahl der Kontaminanten nach der Sterilisationsperiode t_2

Ein zusätzlicher Sicherheitsfaktor wird einberechnet bei der Annahme, daß die gesamte Kontaminantenpopulation aus der hitzeresistentesten Sporenspezie besteht.
Obwohl Sterilität ein absoluter Zustand ist, sollte nicht übersehen werden, daß sein Erreichen durch Hitzebehandlung ein wahrscheinliches ist.
Die Wahrscheinlichkeit, daß alle der N_o Sporen während der Zeit t bei gegebener Temperatur inaktiviert werden, ist:

$$P = (1 - e^{-kt})^{N_o}$$

Folglich ist die Wahrscheinlichkeit, daß wenigstens eine Spore die Hitzebehandlung übersteht:

$$1 - P = 1 - (1 - e^{-kt})^{N_o}$$

Der Sterilitäts-Level N kann wie folgt ausgedrückt werden:

$$N = 1 - P$$

Die kleinste Anzahl lebender Sporen, die eine Kontamination verursacht, ist 1, unabhängig vom Volumen des Mediums. Angenommen, die Wahrscheinlichkeit für eine erfolglose Sterilisation, 1 - P, sei 10^{-3}, so heißt das, daß auf 10^3 Sterilisationen eine erfolglose auftritt.
Soll beim Scale-up die gleiche Gewißheit für eine absolute Sterilität beibehalten werden, so muß die Intensität der Hitzebehandlung erhöht werden. Dies ist wahrscheinlich der Punkt, der beim Scale-up am meisten übersehen wird.
Das Sterilitätskriterium ∇ läßt sich für Scale-up-Berechnungen folgendermaßen schreiben:

$$\nabla = \ln \frac{C_1 V}{1 - P}$$

C_1 = Konzentration der lebensfähigen Sporen
V = Volumen des Rohmediums
$1 - P$ = Wahrscheinlichkeit, daß eine einzige Spore des Volumens V die Hitzebehandlung überlebt.

Sterilisations-Gleichheit für ein gegebenes Medium kann daher durch folgenden Ausdruck wiedergegeben werden, wobei die Indices G und K das große bzw. das kleine Volumen bezeichnen.

$$\nabla_G = \nabla_K + \ln \frac{\nabla_G}{\nabla_K}$$

Für jede 10-fache Zunahme des Arbeitsvolumens - übliche Scale-up-Schritte - muß das Sterilitätskriterium daher um den Betrag 2.3 (= ln 10) erhöht werden. ∇ ist somit volumenabhängig.
Das Nährlösungs-Qualitäts-Kriterium Δ hingegen ist abhängig von der Konzentration eines essentiellen Mediumbestandteils nach der Sterilisation.

$$\Delta = \ln \frac{C_1}{C_2}$$

Hier sind C_1 und C_2 die Pre- bzw. Poststerilisation-Konzentrationen der essentiellen Komponente. In der Gleichung erscheint kein Volumen-Faktor, d.h. Δ ist unabhängig vom Volumen.
Ein sauberes Scale-up für Sterilisationsverfahren erfordert für beide Kriterien Gleichheit. Die Abbildung 66 zeigt ein Prozeßführungs-Diagramm für eine hypothetische Sterilisation.
In dieser Darstellung erscheinen zwei Gruppen von Geraden. Jede Linie der steileren Geradenschar präsentiert den Ort der Sterilisationsbedingungen, die den gleichen Sterilisations-Endpunkt aufweisen, d.h. das Sterilitätskriterium entlang einer Geraden ist identisch. Volumenzunahme und Zunahme von ∇ wird durch die Richtung des Pfeils unten links an-

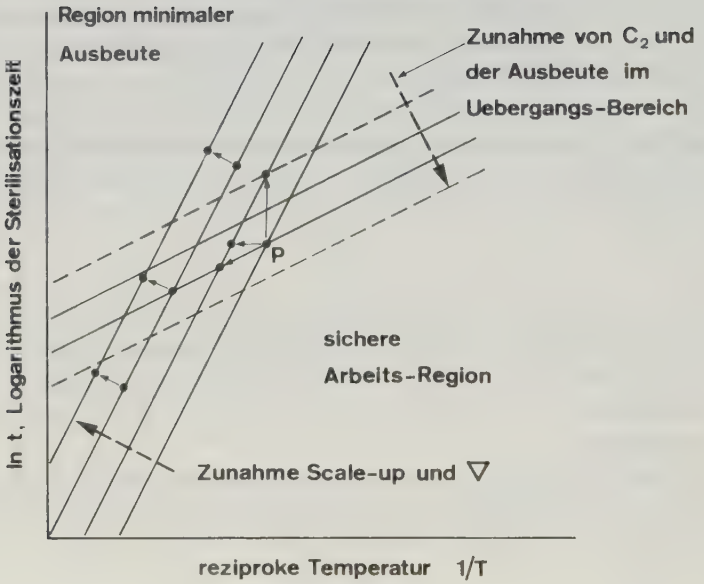


Abb. 66: Prozeßführungs-Diagramm für das Scale-up von Sterilisationen (35).

gezeigt.

Die zweite Gruppe von Geraden zeigt die Orte der Sterilisationsbedingungen, die verschiedene Konzentrationen einer essentiellen Mediumskomponente nach der Sterilisation aufweisen. Diese Linien stellen im wesentlichen Linien konstanter Prozeß-Leistung dar. Die zwei gestrichelten Linien bezeichnen zwei wichtige Begrenzungen: Die obere Linie entspricht der Ausbeute auf einer vernachlässigbaren Restmenge dieses essentiellen Nährstoffs, die untere zeigt die der kritischen Konzentration dieser Komponente entsprechende Ausbeute, die nicht mehr erhöht werden kann. Dies sind die minimale und die maximale Prozeß-Leistungslinie. Sie unter-

teilen das Diagramm in drei Regionen. Die obere ist die der minimalen Ausbeute. Ein weiteres Vordringen in diesen Abschnitt hat keinen Einfluß auf die Ausbeute, da die Qualität des Mediums zu gering ist. Die untere Region ist die sichere Arbeits-Region. Auch hier bringt ein weiteres Vordringen keinen Effekt auf die Ausbeute, da die kritische Konzentration an essentiellem Nährstoff in jedem Punkt gegeben ist, sodaß die maximale Ausbeute jederzeit erreichbar ist.

In der Übergangszone zwischen diesen Linien hingegen ist ersichtlich, daß die Prozeßführung beeinflußt werden kann. Betrachtet man nämlich den Punkt P in der Übergangsregion, so ist evident, daß ein Erhöhen der Zeit und/oder Temperatur ein Sinken der Ausbeute bewirkt. Bewegt man sich hingegen entlang der Geraden konstanter Ausbeute, ist ein reproduzierbarer Prozeß zu erwarten. Dies führt zu einem wichtigen Schluß: Durch Verminderung der Sterilisationszeit und Erhöhen der Sterilisationstemperatur kann die Schädigung des Mediums reduziert werden. Dies bedingt sehr kurze Aufheiz- und Abkühlphasen.

Bei Batch-Sterilisationen wird das Temperatur-Zeit-Profil durch die Aufheiz- und Abkühlphase des Fermenters wiedergegeben. Erfolgt der Wärmeaustausch über einen Doppelmantel, ist der Kurvenverlauf für beide Phasen exponentiell und kann durch nachstehende Formel ausgedrückt werden (34):

$$T = J\ (1 + b \cdot e^{-kt})$$

Phase	b	k	J
Heizen	$\frac{T_o - T_H}{T_H}$	$\frac{U\ A}{M\ c}$	T_H
Kühlen	$\frac{T_o - T_{c_o}}{T_{c_o}}$	$\frac{w\ c}{M\ c}\left(1 - e^{-UA/wc}\right)$	T_{c_o}

A = Oberfläche des Wärmetauschers (m^2)
M = Masse des Mediums im Fermenter (kg)
T, T_H, T_o, T_{c_o} = absolute Temperatur des Mediums, der Wärmequelle (Dampf), des Mediums (t=0) und des Kühlmittels beim Eintritt.
U = Gesamter Wärmetransfer-Koeffizient (kcal/sec m^2 ^oC)
c = spezifische Wärme des Mediums, Kühlmittels (kcal/kg ^oC)
t = Zeit des Wärmetransfers (sec)
w = Durchflußrate des Kühlmittels (kg/sec)

Um einen steilen Anstieg der Aufheizkurve zu erreichen, sollten T_H und/oder k möglichst groß gewählt werden. T_H läßt sich aus Sicherheitsgründen nicht beliebig erhöhen. Wie aus k zu entnehmen ist, verläuft der Anstieg der Aufheizkurve für Kleinfermenter steiler, da das Verhältnis A/M günstiger ausfällt. Eine Wärmeisolation gegen den Außenraum vermindert die Wärmeverluste, was zu einer Erhöhung von U führt.

Ein steiler Abfall des Kurvenverlaufs beim Kühlen erfordert ein niedriges T_{c_o} und ein großes k. Das T_{c_o} ist bei Wasserkühlung durch die Wassertemperatur gegeben. k läßt sich merklich durch die Durchflußrate w des Kühlmittels erhöhen.
Ein optimales Temperatur-Zeit-Profil läßt sich bei der kontinuierlichen Sterilisation verwirklichen. Einerseits lassen sich durch das günstige Verhältnis der Wärmetauscheroberfläche zum Mediumvolumen sehr kurze Aufheiz- und Abkühlphasen realisieren, andererseits sind kontinuierliche Sterilisatoren auch bei hohen Temperaturen (Drücken) einsetzbar.

1.2. Sterilisation der Belüftungsluft

An die Reinheit der Belüftungsluft werden hohe Anforderungen gestellt: Sie muß staub-, öl- und wasserfrei sein und darf keine Keime enthalten.
Dank der enormen Entwicklung im Bau von Sterilfiltern hat sich zur Gewinnung steriler Luft in der Fermentationstech-

nik die Filtration durchgesetzt (3). Das Filtermaterial moderner Filter ist dreidimensional geschichtet in der Form eines Hohlzylinders, einer sogenannten Filterkerze. Als Filtermaterial dienen sowohl gesinteter Edelstahl und Teflon, mit Kunstharz gebundenes Carborundum wie Faservliese aus hochfeinen Glasfasern.
Obwohl in diesem Fall von mechanischer Filtration gesprochen wird, ist die Filterwirkung nicht eine rein mechanische aufgrund der labyrinthartigen Strömungswege, sondern sie beruht zusätzlich auf Adhäsionskräften.
Die Standzeit der Sterilfilter ist stark abhängig von der Feststoffpartikelverunreinigung in der Druckluft, d.h. es sollte nur vorgereinigte Druckluft verwendet werden. Ein erhöhter Differenzdruck (z.B. 0.7 bar) weist auf zu kleine Dimensionierung der Filterfläche oder auf deren Verschmutzung hin. Je nach Filtermaterial müssen die Filterkerzen gereinigt oder ausgetauscht werden.
Die Filter können durch direkten Anschluß an eine Dampfleitung oder, wie beim hier beschriebenen Fermentertyp, separat im Autoklaven sterilisiert werden. Das separate Sterilisieren hat den großen Vorteil, daß kein Kondensat in die Nährlösung gelangen kann, sodaß diese weder qualitativ noch quantitativ verändert wird.
Die Filterkerzen bestehen aus mit Kunstharz gebundenem Carborundum (Schumacher'sche Fabrik, Bietigheim, Deutschland). Sie sind in Filtereinheiten untergebracht, die mit einer Hohlnadel für den nachträglichen sterilen Einbau versehen sind (vgl. III.1.).
Die Zuluft passiert das Zuluftfilter und gelangt durch das Belüftungsrohr in den unteren Abschnitt des Fermenterkessels. Die Abluft wird ebenfalls über ein Filter ins Freie geleitet. Dank des vorgeschalteten Rückflußkühlers bleibt der Abluftfilter stets trocken, und die Volumenabnahme als Folge der Verdunstung ist minimal. Zuluft- und Abluftfilter sind in ihrer Bauform identisch.

2. Rührung und Belüftung

Der Fermenter ist ein heterogener chemischer Reaktor, speziell bezüglich Stoff- und Wärmeübergang. Die chemische Reaktion, oder besser, der Komplex chemischer Reaktionen, die zu Zellwachstum und Produktbildung führen, benötigen einen Austausch der verschiedenen Reaktanten und Reaktionsprodukte, sowie der Wärme, mit der umgebenden Flüssigphase (vgl. Abb. 67).
Neben anderen Reaktanten muß bei aeroben Fermentationen Sauerstoff an die Zellen geführt werden. Aufgrund seiner geringen Löslichkeit in Wasser wird gasförmiger Sauerstoff, üblicherweise in Form von Luft, kontinuierlich in die Nährlösung eingebracht und zwar so, daß die Sauerstoffabsorptionsrate mindestens seiner Verbrauchsrate entspricht.
Die in den folgenden Kapiteln erscheinenden Abhandlungen gelten selbstverständlich nicht nur für den Sauerstofftransfer, sondern sie können auf jedes limitierende Substrat und

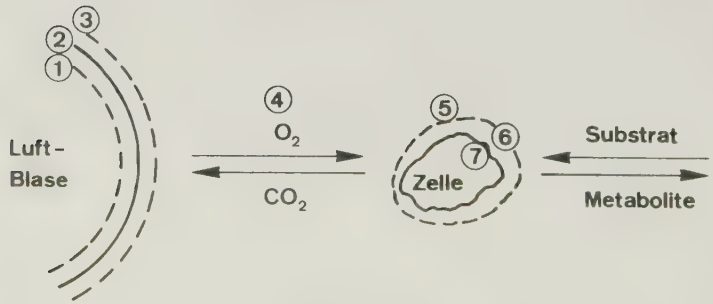


Abb. 67: Illustration der Stofftransport-Wege in einer Kulturlösung (72). Die Nummern bezeichnen die einzelnen Schritte, bzw. deren Widerstände: 1, Gas-Film; 2, Gas-Flüssigkeits-Grenzschicht; 3, Flüssigkeits-Film; 4, Flüssigkeitsphase; 5, Flüssigkeits-Film; 6, intrazellulär oder innerhalb des Pellets; 7, biochemische Reaktion

Stoffwechselprodukt übertragen werden. In entgegengesetzter Richtung zum Substrattransport verläuft, wie aus Abb. 67 ersichtlich ist, derjenige der Stoffwechselprodukte, dessen Transportmechanismen bei den einzelnen Schritten mit denjenigen der Substrate identisch sind, abgesehen davon, daß der jeweilige Konzentrations-Gradient in entgegengesetzter Richtung vorliegt. Sauerstoff wurde deshalb als Beispiel gewählt, weil er aufgrund seiner geringen Löslichkeit in vielen Prozessen der limitierende Faktor ist und für diesbezügliche Untersuchungen seit der Einführung von Sauerstoffelektroden relativ einfach meßbar ist. Der Transport anderer Substrate oder der von Metaboliten ist aber nicht weniger kritisch und wird daher in der abschließenden Diskussion noch näher erörtert.

2.1. Sauerstoff-Eintrag und -Bedarf

2.1.1. Löslichkeit von Sauerstoff

Sauerstoff gehört zu den schwach löslichen Gasen in Wasser. Seine Löslichkeit ist prinzipiell unabhängig vom Totaldruck und der Anwesenheit anderer Gase. Sie ist hingegen direkt proportional dem Sauerstoff-Partialdruck in der Gasphase. Diese Tatsache, bekannt als Henry'sches Gesetz, kann geschrieben werden als

$$c_L^* = \frac{1}{H} p_{O_2}$$

wobei H die Henry-Konstante bedeutet. p_{O_2} ist der Sauerstoff-Partialdruck in der Gasphase und c_L^* seine Konzentration in der Flüssigkeit im Gleichgewichtszustand. Üblicherweise wird die Konzentration eines gelösten Gases durch den Löslichkeits-Koeffizienten α nach Bunsen in cm^3/cm^3 MPa angegeben. Der α-Wert eines einzelnen Gases wird durch zwei Faktoren beeinflußt. Erstens wie aus den Werten der Tabelle 4 ersicht-

lich ist, nimmt die Löslichkeit mit steigender Temperatur ab, zweitens wird die Löslichkeit merklich verringert durch die Anwesenheit gelöster Salze (oder Flüssigkeiten, nicht aber Gasen) in der Flüssigkeit. Durch die Hydration (Anlagerung von Wassermolekülen an Ionen) stehen weniger freie Wassermoleküle zum Lösen des Gases zur Verfügung (vgl. Tab. 5).

Tab. 4: Einfluß der Temperatur auf die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser

Temperatur °C	α_{H_2O}, ml/ml atm	α_{H_2O}, cm^3/cm^3 MPa	Referenz
0	0.04872	0.4808	(110)
10	0.03793	0.3743	(110)
15	0.03441	0.3396	(110)
18	0.0322	0.3178	(31)
20	0.03091	0.3051	(110)
25	0.02822	0.2785	(110)
28	0.0271	0.2675	(31)
30	0.02612	0.2578	(110)
37	0.02403	0.2372	(31)
38	0.0237	0.2339	(31)

Tabelle 5: Einfluß von Salzen auf die Löslichkeit von Sauerstoff. Die Werte stammen aus UMBREIT et al. (110), wurden aber in cm^3/cm^3 MPa umgerechnet

Konzentration	HCl, 15° C	HCl, 25° C	NaCl, 25°C
0.5 M	0.326	0.267	0.243
1.0 M	0.306	0.257	0.197
2,0 M	0.276	0.247	0.158

2.1.2. Sauerstoff-Bedarf

Die Zellrespiration erfolgt in einer Rate, die von der gelösten Sauerstoffkonzentration unabhängig ist, solange diese oberhalb eines kritischen Wertes C_{crit} liegt. Als C_{crit} wird die niedrigste Sauerstoffkonzentration definiert, bei der die Organismen noch keine Symptome einer Sauerstoff-Limitierung zeigen. Unterhalb C_{crit} folgt die Respiration der Michaelis-Menten-Gleichung (3). Die Verbrauchsrate läßt sich schreiben als

$$\text{Verbrauchsrate} = Q_{O_2} \cdot X \qquad (1)$$

wobei X die Zellmasse und Q_{O_2} die spezifische Sauerstoff-Verbrauchsrate ist. Es sollte nicht übersehen werden, daß der Q_{O_2}-Wert eine strenge Abhängigkeit sowohl von den Kulturbedingungen wie vom jeweiligen Organismus zeigt.

2.2. Widerstände beim Sauerstoff-Eintrag

Wie die Abbildung 67 zeigt, erfolgt der Sauerstofftransport von der Gasblase an die Zelle in einer Serie von Einzelschritten, von denen jeder seinen eigenen Widerstand aufweist. Die relative Bedeutung eines jeden dieser Widerstände ist systemabhängig.

2.2.1. Die Absorptionsgleichung

Die Rate, mit der Sauerstoff in Lösung gebracht werden kann, ist proportional sowohl der Grenzfläche zwischen Gasblasen und Flüssigkeit, wie der Erschöpfung an gelöstem Sauerstoff in dieser Flüssigkeit. Die Absorptionsrate für eine Volumeneinheit der Kulturflüssigkeit läßt sich daher ausdrücken als

$$\text{Absorptionsrate} = K_L a \, (C_L^* - C_L) \qquad (2)$$

wobei C_L die aktuelle und C_L^* jene Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase ist, die mit ihrem Partialdruck in der Gasphase im Gleichgewicht steht. $(C_L^* - C_L)$ wird als treibende Kraft (driving force) bezeichnet. Die Proportionalitätskonstante K_L kann als Gesamtleitwert betrachtet werden. Ihr Kehrwert $1/K_L$, ein Gesamtwiderstand, ist gleich der Summe der Einzelwiderstände des Gasfilms, der Grenzschicht und des Flüssigkeitsfilms. Wenn diese Widerstände groß sind, wird K_L klein und umgekehrt. Das Produkt K_La kann indirekt gefunden werden durch Messungen von C_L (z.B. O_2-Elektrode), C_L^* (mittels Henry-Gesetz) und der Absorptionsrate. K_La ist der volumetrische Sauerstoffübergangs-Koeffizient mit der Einheit der reziproken Zeit (h^{-1}) und ist ein Maß für die Gasabsorptions-Kapazität eines Fermenters. Er ist eine Funktion der Belüftung-Rühr-Intensität und der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Nährlösung. Da in einem steady-state die Absorptionsrate genau der Verbrauchsrate entspricht, kann der linke Teil der Gleichung (2) durch Q_{O_2} ersetzt werden. Die explizite Form der Gleichung für K_La mit bekannten oder meßbaren Größen ist

$$K_La = \frac{Q_{O_2} \cdot X}{(C_L^* - C_L)} \qquad (3)$$

2.2.2. Methoden zur K_La-Messung

Einer der wichtigsten Parameter zur Beurteilung von Fermenterleistungen und als Basis für das Scale-up ist die O_2-Transfer-Rate (OTR). Diese kann mit dem Begriff des Sauerstoffübergangs-Koeffizienten ausgedrückt werden, wenn die treibende Kraft $(C_L^* - C_L)$ ermittelt werden kann. Leider sind die aus der Literatur ersichtlichen Daten spärlich und sehr oft widersprüchlich. Dies trifft vor allem für das große Gebiet der viskosen Mycel-Fermentationen zu.

Es existieren verschiedene Techniken zur Ermittlung von K_La. Die Sulfit-Methode (33) beruht auf der chemischen Oxidation von Natriumsulfit zu Natriumsulfat. Der größte Nachteil dieser Methode besteht darin, daß sie aufgrund ihrer einfachen Anwendung immer wieder zu Fermentationsuntersuchungen herangezogen wird. GREENHALGH et al. (47) kamen zum Schluß, daß eine Übereinstimmung der Daten der Sulfit-Methode mit solchen aus biologischen Systemen rein zufällig wäre, was auch von anderen Autoren bestätigt wird (37, 44, 58, 79, 109, 114).

Weitere Verfahren sind:

- gassing-out oder static gassing-out (109)
- dynamic gassing out (10, 103, 108, 109, 114)
- steady-state oxygen balance (37, 103, 109, 114).

Diese sollen hier nicht näher erläutert werden, da alle noch mit Fehlern behaftet sind (37). Schwierigkeiten entstehen sowohl bei der Bestimmung von C_L^* (37, 109, 114) wie bei C_L (69, 109). Eine weitere Einschränkung ergibt sich daraus, daß Fermenter, vor allem im Großmaßstab, die mit Blattrührern ausgestattet sind, in viskosen Kulturmedien keine homogene Mischung erreichen (14, 23, 103).

2.2.3. Individuelle Widerstände und K_La

Es ist mehr als nur theoretisches Interesse, die Einzelwiderstände näher zu prüfen. Der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Sauerstoffabsorption kann nicht der Gasfilm sein. Bei einem so gering löslichen Gas wie Sauerstoff ist die treibende Kraft durch den Gasfilm um soviel größer als die durch den Flüssigkeitsfilm, daß dieser bestimmt einen größeren Widerstand aufweist (44). Die Faktoren, die K_La beeinträchtigen, sind: die Oberfläche des Gas-Flüssigkeit-Kontaktes, die Kontaktzeit und die Rührintensität. Einerseits beeinflußt die Grenzschicht a zwischen Gasblasen und Flüssigphase die Gasdiffusion durch ihre Größe, d.h. die eingetragene Luft sollte möglichst in eine große Anzahl feinster Blasen ver-

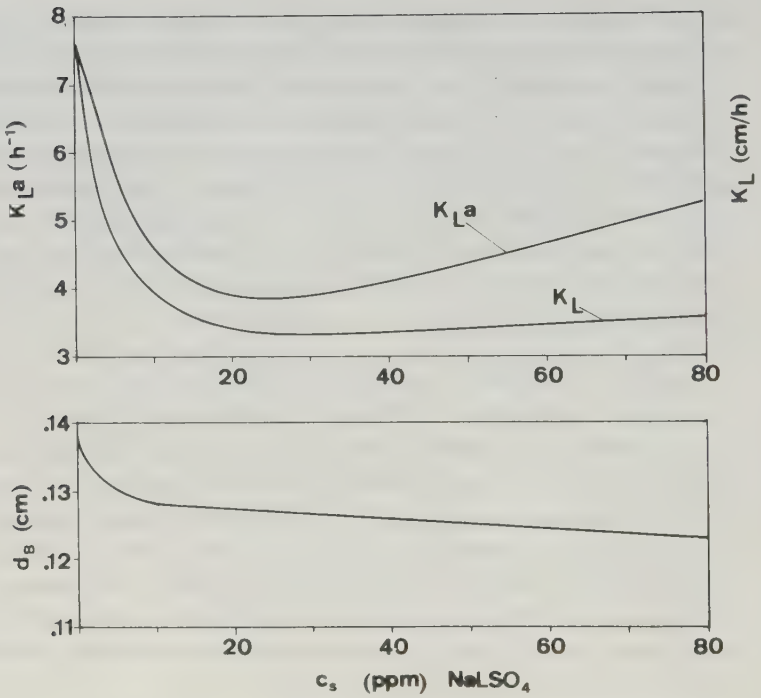


Abb. 68: a) Einfluß oberflächenaktiver Substanzen auf $K_L a$ und K_L.

b) Einfluß oberflächenaktiver Substanzen auf die Blasengröße d_B (3). Auf die Abszisse ist in beiden Bildern die Konzentration an Natrium-Lauryl-Sulfat in Wasser aufgetragen.

teilt werden, um so ein günstiges Verhältnis der Blasenoberfläche zu ihrem Volumen zu erhalten (vgl. IV.2.3.1.). Andererseits ist aus Arbeiten von AIBA et al. (6), AIBA et al. (3) und WANG et al. (114) bekannt, daß organische Medienbestandteile wie z.B. Pepton und oberflächenaktive Substanzen wie Antischaummittel einen Einfluß auf die Blasengröße und auf die Diffusion ausüben. Diese Befunde sind in Abb. 68 a) und b) dargestellt.

Oberflächenaktive Substanzen sind, wie aus Abb. 69 hervorgeht, an der Gas-Flüssigkeits-Grenzschicht in den Flüssigkeitsfilm eingelagert.

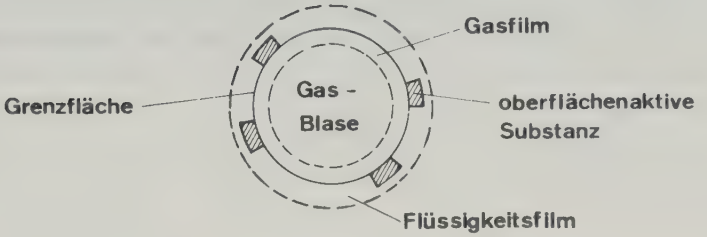


Abb. 69: Einlagerung oberflächenaktiver Substanzen in den Flüssigkeitsfilm um die Gasblase (114)

Aus der Oberflächen-Widerstands-Theorie, wie sie von TIMSON et al. (106) vorgeschlagen wird, kann gefolgert werden, daß der Effekt von oberflächenaktiven Substanzen auf K_L nicht notwendigerweise auf einer Erhöhung des Widerstandes der Sauerstoffdiffusion von der Luftblase in die Flüssigkeit beruht, sondern daß diese Substanzen eine dämpfende Wirkung auf die komplizierte Bewegung in der Grenzschicht ausüben.

Die Kontaktzeit ist eine Funktion der Blasengröße und des Mischeffektes (vgl. IV.2.4.).

2.3. Widerstände auf der Bedarfsseite

2.3.1. Flüssigkeitsfilm um Zellen oder Zellaggregate

Zellen und Zellaggregate (Pellets) werden in den folgenden Betrachtungen als kugelförmig angenommen (3, 39, 56, 82). Die explizite Form der Sauerstoffdiffusion durch den Flüssigkeitsfilm an die Zelloberfläche läßt sich im steady-state schreiben als

$$\frac{4}{3}\pi R^3 \cdot \rho_m \cdot Q_{O_2} = K_S \cdot 4\pi R^2 (C_L - C_R)$$

oder

$$(C_L - C_R) = \frac{Q_{O_2} R \rho_m}{3 K_S} \qquad (4)$$

wobei K_S die O_2-Transfer-Rate durch den Flüssigkeitsfilm an der Oberfläche der Zelle und R deren Radius darstellt. C_L und C_R sind die O_2-Konzentrationen in der Nährlösung bzw. an der Zelloberfläche. ρ_m ist die Myceldichte.
Aus Gleichung (4) kann man ersehen, daß die Konzentrationsdifferenz wächst, wenn sich die spezifische Verbrauchsrate oder der Radius (oder auch die Schichtdicke des Films) vergrößert, oder der Sauerstoffübergangs-Koeffizient sich verringert. Für einzellige Organismen, deren Radius sehr klein ist, und die relativ hohe K_S-Werte aufgrund der niedrigen Viskosität der Nährlösung aufweisen, kann der Widerstand des Flüssigkeitsfilms nicht limitierend werden (44, 71). Wenn es gelingt, Zellen und Flüssigkeit in einer relativen Geschwindigkeit zueinander zu bewegen, kann die Dicke des Flüssigkeitsfilms reduziert werden. Diese Geschwindigkeitsdifferenz ist primär eine Funktion der Turbulenz und sekundär der unterschiedlichen spezifischen Schwerkraft der einzelnen Masseteilchen. Aufgrund der größeren Gravitation von Zellaggregaten, weisen diese gegenüber Einzelzellen ein erhöhtes Beharrungsvermögen auf. Je größer der Radius des Pellets wird, umso größer wird der Substratfluß pro Oberflächeneinheit,

doch der limitierende Widerstand liegt nicht im Flüssigkeitsfilm um das Pellet, sondern innerhalb von diesem.

2.3.2. Sauerstoffübergang in Mycel-Pellets

PHILLIPS (82) beobachtete, daß bei Pellet-Bildung in Fermentationen mit Penicillium chrysogenum sehr hohe Werte an gelöstem Sauerstoff notwendig waren, um eine vernünftige Produktivität zu erhalten. Daraus wurde geschlossen, daß eventuell ungenügende Sauerstoffdiffusion in das Innere des Pellets der limitierende Faktor für die Produktion sein könnte. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Autoren gemacht (28, 44, 56, 71, 74, 116).
Bei Steady-state-Bedingungen ist die Sauerstoff-Diffusionsrate in ein Volumenelement gleich der Sauerstoff-Verbrauchsrate in diesem Volumen.

$$\frac{4}{3}\pi r^3 \cdot \rho_m \cdot Q_{O_2} = 4\pi r^2 \cdot D \cdot \left.\frac{dC}{dr}\right|_r \qquad (5)$$

wobei Q_{O_2} = spezifische O_2-Verbrauchsrate der Zellen in einem Pellet (mmol O_2/cm^3 min)
D = Diffusionsgeschwindigkeit (cm^2/min)
$\left.\frac{dC}{dr}\right|_r$ = O_2-Konzentrationsgradient beim Radius r (nmol O_2/cm)

Unter der Annahme, daß Q_{O_2} unabhängig von der gelösten Sauerstoffkonzentration ist, liefert die Integration von Gleichung (5) das Sauerstoffkonzentrations-Profil in einem Pellet.

$$C_r = C_R - \frac{Q_{O_2} R^2}{6 D} \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right) \qquad (6)$$

wobei C_r = O_2-Konzentration beim Radius r
C_R = O_2-Konzentration beim Radius R.

Ein Pellet zeigt Symptome eines Sauerstoff-Defizits, wenn die Sauerstoffkonzentration im Zentrum des Aggregates unter die wirkliche kritische Konzentration C_T fällt. Die scheinbar kritische Konzentration C_A kann daher aus folgender Gleichung, die aus Gleichung (6) abgeleitet ist, berechnet werden

$$R = \left(\frac{6\ D}{Q_{O_2}}\right)^{1/2} (C_A - C_T)^{1/2} \qquad (7)$$

Dies zeigt, daß es bei großen Pellets ziemlich schwierig ist, im Innern des Pellets eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu erreichen, es sei denn, die gelöste Sauerstoffkonzentration im Medium sei hoch. Wenn man voraussetzt, daß Q_{O_2} unabhängig vom gelösten Sauerstoff-Level ist, kann aus Gleichung (6) der Effekt dieses Levels auf die Sauerstoffverbrauchs-Rate des Pellets errechnet werden

$$C_R = \frac{Q_{O_2} R^2}{6\ D} \left(1 - \frac{r_o^2}{R^2}\right) \qquad (8)$$

wobei r_o = Radius, bei welchem die gelöste O_2-Konzentration Null ist.

Unter sauerstofflimitierenden Bedingungen ist die Fraktion des Pellets, die ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird

$$\frac{\frac{4}{3}\pi R^3 - \frac{4}{3}\pi r_o^3}{\frac{4}{3}\pi R^3} = 1 - \left(\frac{r_o}{R}\right)^3 \qquad (9)$$

2.4. Rühren

Bei Fermentationen ist das Problem des Rührens ziemlich verworren in dem Sinne, daß die kritische Funktion der Rührung für den jeweiligen Prozeß im allgemeinen nicht bekannt ist. Es ist unschwer zu erkennen, daß die in der Fermentation verwendeten Arten des Rührens und Mischens mehr oder weniger unkritisch aus der chemischen Verfahrenstechnik übernommen wurden. Es geht hingegen in der Fermentation um bedeutend mehr als nur um einen Stoff- und Wärmetransport im üblichen Sinne. Diese lassen sich relativ einfach quantitativ erfassen. Schwierigkeiten entstehen, wenn die Flüssigkeit kein Newton'sches Verhalten zeigt, was auf alle Mycelfermentationen zutrifft (3, 14, 23, 49, 58, 72, 79, 103, 109, 114) und sich diese Eigenschaften im Verlaufe eines Prozesses extrem verändern.

Organismen müssen kontinuierlich mit essentiellen Nährstoffen in einer genügend hohen Rate versorgt werden, um eine Limitierung ihrer metabolischen Aktivität zu verhindern. Gleichzeitig müssen Stoffwechselprodukte kontinuierlich ausgetragen werden, um einer Inhibierung von Wachstum und Produktion vorzubeugen. Werden diese Bedingungen - selbst kurzzeitig - nicht erfüllt, kann die Kultur irreversibel geschädigt werden (10, 26, 39, 40, 64, 76). Eine Verarmung oder Erschöpfung zeigt sich zuerst bei der Bereitstellung der Hauptnährstoffe, d.h. bei der Kohlenstoffquelle und beim Sauerstoff, da diese die höchsten Verbrauchsraten aufweisen. Die Nachlieferung von Nährstoffen ist - so wie deren Verbrauchsrate - eine Funktion der Zeit. Weist die Nährlösung eine große Reserve an gelösten Nährstoffen auf, ist die Versorgung der Organismen relativ problemlos. Bedeutend höhere Anforderungen werden dann an das Rührsystem gestellt, wenn Nährstoffe von außen stets neu zugeführt werden müssen, wie dies für die Sauerstoffversorgung aber auch für Feeding- und kontinuierliche Prozesse zutrifft (23, 48). Um eine möglichst schnelle und feine Verteilung von neu eingebrachtem Substrat zu erreichen, sollten die Einlaßpunkte in Rührernähe postiert sein, was für die meisten Belüftungssysteme zutrifft. Die

Luftblasengröße und deren Verteilung ist weniger eine Funktion der Einlaßdüse, sondern hängt vom Grad der Turbulenz ab. Es ist klar, da der Maximalwert für ΔC in der Gleichung (2) limitiert ist, daß die Sauerstoffübergangsrate von der Gasblase ins Medium stark von K_L und a bestimmt wird. Verschiedentliche Versuche wurden daher unternommen, K_La in direkten Zusammenhang mit Prozeßvariablen wie P/V, N und v_s zu bringen (P = Rührerleistung, V = Arbeitsvolumen, N = Drehzahl und v_s = Blasengeschwindigkeit). Aufgrund des anhaftenden Empirismus war dies nicht immer realisierbar (23). Wie schon erwähnt, beeinträchtigen die rheologischen Eigenschaften der Kultur den gesamten Massentransfer enorm. Da sich diese Eigenschaften durch das Mycelwachstum im Laufe des Prozesses stark ändern und keinen Newton'schen Charakter aufweisen, sind sie quantitativ schwer erfaßbar. Hier dürfte eine der Ursachen für die Probleme im Scale-up zu finden sein.

Der grundsätzliche Charakter des Massenaustausches bewegter Medien im hydraulischen Sinne ist prinzipiell durch die Geschwindigkeitsdifferenz zwischen den einzelnen Masseteilchen und im weiteren durch die primäre Funktion der Turbulenz gegeben. In einer turbulenten Flüssigkeitszone entstehen Primär-Wirbel z.B. durch Rührertätigkeit als Wellen. Die Größe dieser Wirbel ist abhängig von den Rührerdimensionen. Primär-Wirbel sind nicht isotrop, d.h. es entstehen gleichgerichtete Strömungsfäden, sie sind unstabil und spalten sich in kleinere Wirbel mittlerer Größe auf, die isotrop sein können. Unter Umständen spalten sich diese Intermediär-Wirbel weiter auf in sogenannte Terminal-Wirbel, die vollständig isotrop sind. Diese setzen die meiste Energie frei (72). Das optimal wirksame Rührwerk überführt die ihm übergebene Arbeitsenergie weniger in laminare Bewegung, sondern verwandelt sie weitgehend in echte Turbulenz. Die bekannten Rührsysteme können diese Bedingungen nur schlecht erfüllen, obwohl die Betrachtung unter Umständen heftige Strömung erkennen läßt. Bei näherer Beobachtung wird die Bildung von Strömungsadern ersichtlich, die jedoch nur an den Trennungs-

flächen eine gewisse Turbulenz aufweisen. Zusätzliche Einbauten wie Prallbleche und Schikanen können daran prinzipiell nichts ändern. Der im Behälter rotierende Strömungsmechanismus ist geschaffen, um dem Medium einen Drall und eine Translationsbewegung zu erteilen, eine Vermischung erfolgt erst sekundär. Durch den Einbau von Prallblechen können tote Zonen geschaffen werden, d.h. Zonen, die zu wenig oft mit solchen in Rührernähe vermischt werden, um sich dort mit Sauerstoff neu zu beladen und CO_2 und Wärme abzuführen (23, 39, 105). Anders liegen die Verhältnisse bei der Anwendung eines hydraulischen Treibstrahles. Bei hydraulisch und konstruktiv richtig abgestimmten Verhältnissen werden die einzelnen Masseteilchen im Kessel derartig gesteuert, daß sie sich in turbulenten wendelförmigen Bahnen zwangsläufig bewegen. Es tritt weder ein Drall auf noch ergeben sich mechanisch störende Vibrationen. Der visuelle Unterschied gegenüber einem Rührkessel üblicher Bauart ist bezeichnend. Während bei diesem die Flüssigkeit sich in Bahnen deutlich bewegt, ist bei der Anwendung des Treibstrahles das Bild äußerlich fast ruhig, ähnlich dem Bild einer kochenden Flüssigkeit, deren Masseteilchen einer äußerst turbulenten inneren Translation unterworfen sind.

In den üblichen Fermentern ist die Oberfläche, an welcher der Gasaustritt möglich ist, mit dem Kesseldurchmesser begrenzt. Die für die Belüftung eingeblasene Luft führt je nach Zusammensetzung des Mediums zur Schaumbildung, die zu einem wesentlichen, den Prozeß störenden Faktor anwachsen kann. In den konventionellen Fermentern wird durch einen über dem Kulturmedium liegenden großen Raum (bis zu 1/3 des Gesamtvolumens) diesem Umstand Rechnung getragen. Übersteigt der Schaum eine bestimmte Höhe, wird ein die Oberflächenspannung des Substrates reduzierendes Antischaummittel in die Nährlösung gegeben. Diese Maßnahme verschlechtert jedoch bedeutend die Gasdiffusion, ändert somit in unzulässiger Weise die Kulturbedingungen im Fermenter. Die Versuche, den Schaum mechanisch zu vernichten, haben bis heute nur bei relativ harmlosen Schaumbildungen Erfolg gebracht. Der ideale Fermenter dürfte den Schaum gar nicht erst entstehen las-

sen und sollte auf die schädigende Wirkung der chemischen, wie auch die an Energieaufwand und technisch anspruchsvolle mechanische Abscheidung verzichten können.
Der Fermenter, System "Intensor", der Firma Giovanola Frères SA, Monthey/Schweiz, unterscheidet sich prinzipiell von den klassischen Fermentern dadurch, daß er kein Rührwerk besitzt und die Erfüllung der wichtigen Parameter durch geeignete Flüssigkeitsführung zu erreichen sucht. Der Fermenter (Abb. 19) besitzt einen eingebauten Leitkörper. Die unten eingebaute Propellerpumpe ermöglicht die Umwälzung des Substrates. Die Flüssigkeit wird von der Pumpe angesaugt und zwischen Leitkörper und Kesselmantel nach oben geführt, wo sie in das Zentrum zurückstürzt. Bei konsequenter Ausbildung der hydraulischen und mechanischen Möglichkeiten können die für die biologische Verfahrenstechnik wichtigen Voraussetzungen ideal erreicht werden:

- Mischen: Durch die ins Zentrum stürzende Flüssigkeit einerseits und durch den Sog der Pumpe andererseits entsteht im Zentrum des Fermenters eine Flüssigkeitssäule mit relativ hoher Geschwindigkeit. Wie eingangs erwähnt, ermöglicht der hydraulische Treibstrahl einen homogeneren Mischeffekt zu erreichen, d.h. im Gemisch eine hohe Turbulenz ohne zusätzlich nötigen Kraftaufwand zu erzeugen.
- Sauerstoffübergang: Der Sauerstoffübergang in die Flüssigkeit wird durch die turbulente Strömung auf optimale Werte gebracht. Aufgrund der sehr feinen Blasenbildung und -Verteilung kann die Retensionszeit der Luftblasen gesteigert werden. Dadurch sind verminderte Belüftungsraten erforderlich. Die durch den Stoffwechsel entstehenden Gase finden für ihren Austrag durch den steten Wechsel der großen Oberfläche im Überwurf günstige Bedingungen vor.
- Temperaturführung: Durch die hohen Geschwindigkeiten an den Kesselwänden, die als Wärmetauscher fungieren, sind hohe Übergangszahlen (850 kcal/m^2 ^oC h) möglich.
- Regelfähigkeit: Durch den hohen Mischeffekt des Systems arbeiten die Regelkreise mit kleinen Totzeiten, was die Regelung verfeinert und erleichtert.

- Schaumbildung: Durch den Treibstrahl und den Sog der Pumpe werden Schaumkronen nach unten mitgerissen. Dadurch können keine stehenden Schaumkronen, die den Gasaustritt blockieren, entstehen.

Durch den unten eingebauten Antrieb bzw. die Pumpe bleibt die Deckelfläche frei von Aufbauten. Die Antriebselemente sind in der Nähe der Fundamente angeordnet. Die Pumpe erhält durch diese Konstruktion günstige Lagerverhältnisse, die wiederum eine große Betriebssicherheit der Abdichtelemente garantiert. Die Umwälzpumpe ist strömungstechnisch sorgfältig ausgebildet und arbeitet bei geringen Scherkräften. Die mechanische Beanspruchung der Organismen bleibt daher minimal.

Um die Leistung verschieden großer Fermenter vergleichen zu können (Scale-up), müssen die Abmessungen der Apparate geometrisch in gleicher Reihe liegen. Werden als Ordnungsprinzip die Normzahlen nach DIN 323 verwendet, so lassen sich die Abmessungen auf halblogarythmischem Papier als Geraden darstellen. Weil die Rühreffekte durch hydraulische, gesetzmäßig erfaßbare Mittel erreicht werden, lassen sich die zu erwartenden Resultate ebenfalls im Zusammenhang mit diesen Normzahlen erfassen. Dies könnte Erleichterungen für das Scale-up bringen.

Wie MIURA (71) feststellen konnte, beruht der erhöhte Sauerstoffverbrauch von Mycel-Pellets bei Erhöhung der Rührintensität nicht alleine auf dem dadurch bedingten vergrößerten Sauerstoffeintrag. Die experimentell ermittelten Werte in Abhängigkeit zur Rührerdrehzahl liegen deutlich über den entsprechenden berechneten Diffusions-Werten. Die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs durch erhöhte Rührerdrehzahl beruht daher auf folgenden Mechanismen: 1. Der Penetration der im Medium herrschenden Turbulenz ins Pellet hinein, 2. Der Deformation des Pellets durch Kollision mit dem Rührer und mit benachbarten Pellets oder durch die uneinheitliche Strömung im gerührten Kessel. Durch diese wechselnde Strömungsgeschwindigkeit ist das Pellet Druckschwankungen, die zu seiner Verformung führen, ausgesetzt.

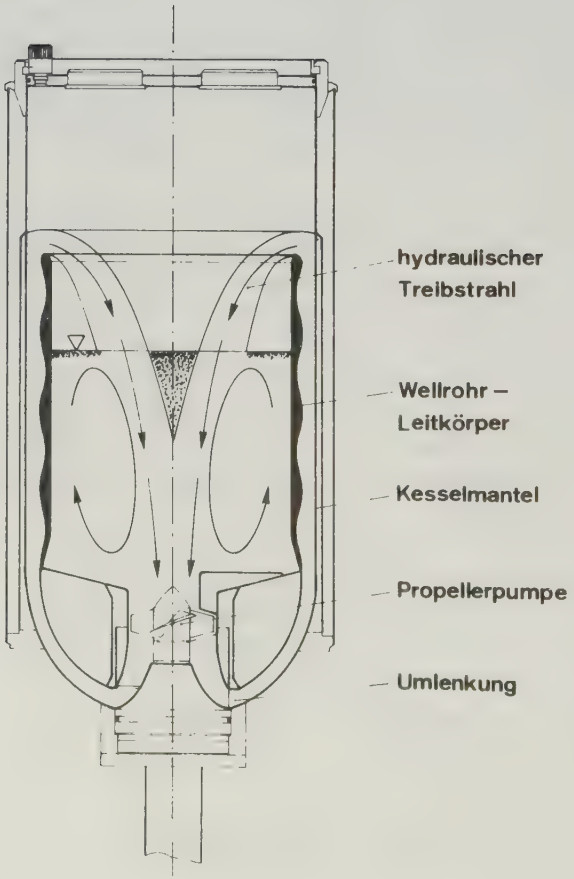


Abb. 70: "Wellrohr"-Fermenter (Prototyp) der Giovanola Frères SA, Monthey/Schweiz

Die Firma Giovanola Frères SA., Monthey/Schweiz hat eine Weiterentwicklung des "Intensor"-Fermenters auf den Markt gebracht, den sogenannten "Wellrohr"-Fermenter, der in Abb. 70 dargestellt ist. Der entlang dem Strömungsweg zwischen Kesselwand und Wellrohr-Leitkörper sich verändernde Querschnitt des Leitsystems bewirkt wegen der Kontinuität der Strömung eine Änderung der Strömungsgeschwindigkeit. Diese bewirkt dann ihrerseits nach der Gleichung von Bernoulli eine Änderung des Druckes. Diese mechanisch erzeugte Pulsation des Druckes bewirkt einerseits eine Änderung der Blasengröße und eine Erhöhung der inneren Blasenturbulenz und andererseits eine Verformung des Pellets. Wird das hydraulische Profil des Strömungsweges vernünftig konzipiert, ergeben sich nur geringfügig höhere Aufwendungen der Pumpenenergie.
Erste Versuche in dieser Richtung wurden hier bereits durchgeführt (11). Für die Untersuchungen erschien die Fermentation von Asposterol, ein Antibiotikum aus Aspergillus micrOcysticus, sehr geeignet, da die Syntheserate direkt von der Belüftung abhängig ist (50, 51). Unter identischen Versuchsbedingungen konnten im Wellrohrfermenter sowohl eine beschleunigte Stoffwechseltätigkeit wie eine Ausbutesteigerung von ca. 40 % gegenüber dem Intensorfermenter festgestellt werden (11). Diese Versuche sind nicht als abgeschlossen zu betrachten, sie könnten aber als richtungsweisend gelten, auf der Suche nach neuen Verfahren für erhöhten Stoffaustausch.

2.5. Methoden zur Regelung des Sauerstoffgleichgewichts

Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff wird in einer belüfteten und atmenden Kultur sowohl durch die Sauerstoffabsorptions-Rate wie durch die Verbrauchsrate der Kultur beeinflußt. Dies ist in der Gleichung (3) wiedergegeben:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a \, (C_L^* - C_L) - Q_{O_2} X \qquad (10)$$

Im Steady-state ist $dC_L/dt = 0$, daraus

$$Q_{O_2} \cdot X = K_L a \, (C_L^* - C_L) \qquad (11)$$

Da keine Methode zur kontinuierlichen Messung der Sauerstoffabsorptions-Rate existiert, dient der gelöste Sauerstoff, welcher das Gleichgewicht zwischen Sauerstoffabsorptions-Rate und Sauerstoffverbrauchsrate ausdrückt, als Regelgröße. Aus Gleichung (11) abgeleitet,

$$C_L = - \left(\frac{X}{K_L a} \right) Q_{O_2} + C_L^*$$

Innerhalb der Grenzen, die durch die Fermenter- und die Rührergeometrie vorgegeben sind, kann die Sauerstoff-Transfer-Rate mittels technischer Parameter geregelt werden. Wenn die Belüftungszahl (vvm) oder die Rührerdrehzahl (rpm) geregelt wird, ändert sich der Energieeintrag in die Flüssigkeit. Folglich ändert sich auch der $K_L a$-Wert. Variiert der Sauerstoff-Partialdruck (p_{O_2}) im System - entweder durch Zumischen von reinem Sauerstoff in die Zuluft oder durch Erhöhung des Kesselinnendrucks - beeinflußt dieser die Sauerstofflöslichkeit C_L^* ($= \frac{1}{H} p_{O_2}$) in obiger Gleichung.

Für die Regelung von C_L bietet sich noch eine andere Möglichkeit: Änderung der spezifischen Aufnahmerate, Q_{O_2}, oder der Konzentration der Mikroorganismen, X (40, 55, 77). Diese Regelkreise werden im Kapitel IV.3. näher erläutert.

3. Regulation

Durch den Katabolismus schnell verwertbarer Kohlenstoffquellen, meistens Glucose, treten vor allem beim Sekundärstoffwechsel Effekte wie Inhibition, Repression oder Inaktivierung von Enzymen auf. So wird unter anderem durch Glucose die Bildung von Penicillin, Cephalosporin, Actinomycin, Violacein, Mitomycin, Bacitracin, Neomycin, Coumermycin, Enterotoxin und von Alkaloiden unterdrückt. Es werden daher in vielen dieser Fermentationen langsamer abbaubare C-Quellen wie Lactose, Galactose, Stärke, höhere Alkohole, organische Säuren, organische Öle etc. verwendet, oder die Glucose wird im Laufe des Prozesses so zudosiert, daß sie einen bestimmten maximalen Wert nicht überschreitet. Die meisten dieser Produktionsverfahren sind rein empirisch entwickelt worden, weshalb über den jeweiligen Wirkungsmechanismus der Glucose nur spärliche oder gar keine Daten vorliegen.
Für Batch-Kulturen wird die spezifische Produktions-Rate (q_p) definiert als $dP/dt = q_p X$, wobei P die Produkt- und X die Biomasse-Konzentration darstellen. Wenn $Y_{P/S}$ (Produktausbeute bezogen auf das verwertete Substrat) konstant ist, ist q_p direkt proportional zur spezifischen Wachstumsrate μ. Für Produkte, wie Sekundärmetaboliten, kann q_p entweder konstant und unabhängig über einen weiten Bereich von μ sein, oder q_p kann in einer komplexen Weise mit μ variieren. Letzteres trifft z.B. auf die Penicillin-Produktion (86) und die Melanin-Bildung (76) zu. Die Überwachung der Produkt-Bildung bedeutet daher in jedem Falle eine Kontrolle von μ.
Das Verhältnis der spezifischen Wachstumsrate μ zur wachstumslimitierenden Substratkonzentration kann durch die Monod-Gleichung ausgedrückt werden:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S}$$

wobei S die wachstumslimitierende Substratkonzentration und K_s deren Sättigungs-Konstante bedeutet. Die maximale Wachstumsgeschwindigkeit μ_{max} und K_s sind, für ein gegebenes Sy-

stem, Organismen-Konstanten, sodaß μ nur über S kontrolliert werden kann. Diese Regelung kann auf verschiedene Weise durchgeführt werden. Die direkte Kontrolle ist die naheliegendste. Hierbei werden die Umweltfaktoren überwacht und direkt manipuliert. Ein Beispiel für ein solches System ist der Turbidostat.
Da zur Zeit noch keine befriedigende Lösung zur kontinuierlichen Messung der limitierenden Substratkonzentration, in diesem Falle für die Glucose, existiert, versucht man diese indirekt über andere, direkt meßbare Parameter, die mit dieser korrelieren, zu erfassen und zu regeln. Prinzipiell bieten sich dafür verschiedene Parameter an, so der pH-Wert, der pO_2-Wert des gelösten Sauerstoffes, Q_{O_2}, Q_{CO_2} und RQ.
Weitere Beispiele einer indirekten Regelung sind die Fed-Batch-Kultur und der Chemostat.
Mit Substrat ist in den folgenden Abschnitten die Kohlenstoffquelle gemeint. Die übrigen Nährstoffbestandteile werden entweder zu Beginn der Fermentation oder mit der Feeding-Lösung so zugegeben, daß sie immer im Überschuß vorhanden sind.

3.1. pH-Feeding

Der Verlauf der pH-Kurve einer Fermentation ist eine Funktion der metabolischen Aktivität der Kultur. Der Abbau von Glucose (Kohlenhydraten) führt zu einer teilweisen Ausscheidung von organischen Säuren, was zu einem Absinken des pH-Wertes führt. Werden anschließend diese Säuren verwertet, steigt der pH-Wert wieder an (80). Die Regelung kann so aufgebaut werden, daß beim Überschreiten eines bestimmten pH-Sollwertes Glucose zugegeben wird. Durch das erneute Ausscheiden von Säuren sinkt der pH-Wert, der durch die Verwertung dieser Säuren wieder ansteigt, sodaß Glucose zugefüttert werden muß. Dadurch erreicht man ein Pendeln des pH-Wertes um den eingestellten Sollwert, wobei stets nur soviel

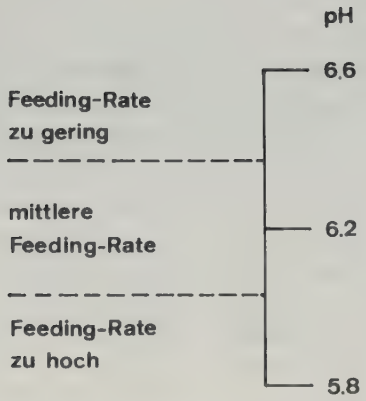


Abb. 71: Die Abhängigkeit zwischen pH-Trend und Glucose-Zugabe

Glucose zudosiert wird, wie die Kultur zum jeweiligen Zeitpunkt benötigt. Die Regelstrecke ist mehrfach verzögert, da die zugegebene Glucose-Lösung im Fermenter erst vermischt und anschließend metabolisiert werden muß, um die Regelgröße zu verändern. Durch die impulsweise Zugabe (vgl. III.7.1.) wird ein Overfeeding vermieden. Die automatische Impulsregistrierung gibt gleichzeitig Einblick in die Prozeß-Kinetik. Eine Veränderung des Sollwertes nach oben verringert die Feeding-Rate, eine nach unten vergrößert diese.
Durch die Zugabe von organischen Säuren anstelle von Glucose oder einem Gemisch dieser beiden Komponenten wird die Regelstrecke weniger verzögert. Ein großer Nachteil des pH-Feeding liegt in der veränderten Ansprechzeit bei fortgeschrittener Fermentation. Anfangs ist das System sehr sensitiv, wird aber im Laufe des Prozesses immer träger. Dies kann einerseits auf die erhöhte Pufferkapazität des Mediums zurückgeführt werden, andererseits könnte die Ursache darin liegen, daß durch die hohe Biomasse, wie sie in solchen Ansätzen erreicht wird, der gelöste Sauerstoff limitierend wird (60).

3.2. p_{O_2}-Feeding

Die Respirationsrate Q ist eine Funktion der spezifischen Substratumsatz-Rate und somit auch der Wachstumsgeschwindigkeit μ. Nach der Michaelis-Menten-Gleichung ist μ eine Funktion der Substratkonzentration. Die Respirationsrate Q, d.h. Q_{O_2} oder Q_{CO_2}, kann nicht direkt gemessen werden. Diese müßte rechnerisch aus den Werten der Abluftanalyse, dem Luftvolumen und der Biomasse ermittelt werden (vgl. IV.4.). Q_{O_2} ist hingegen in der Gleichgewichtsgleichung für Sauerstoff enthalten (vgl. IV.2.5.), in der C_L im Steady-state direkt meßbar ist:

$$C_L = - \left(\frac{X}{K_L a}\right) Q_{O_2} + C_L^*$$

Bei hoher Substratumsatz-Rate ist der Sauerstoffverbrauch entsprechend hoch, was zu einem Absinken des gelösten Sauerstoffwertes führt. Durch die allmähliche Erschöpfung des Substrates sinken die Umsatz-Raten, worauf der C_L-Wert wieder ansteigt.
Wird der Regelkreis so konzipiert, daß beim Überschreiten eines bestimmten Sollwertes Substrat impulsweise zugegeben wird, so bewirkt diese Zugabe aufgrund der nun höheren Substratkonzentration gesteigerte Umsatzraten und somit ein Absinken des gelösten pO_2-Wertes.
Dieser Regelkreis zeigt ein ähnliches zeitliches Verhalten wie beim pH-Feeding, ist jedoch bedeutend sensibler und weist kürzere Ansprechzeiten auf (102). Die Verbrauchsregistrierung zeichnet die Kinetik des Prozesses automatisch auf.
Durch Verändern des Sollwertes kann die Feeding-Rate beeinflußt werden. Ein Verstellen nach oben bewirkt geringere, ein solches nach unten erhöhte Zufütterungsraten.
Wird dieses System bei konstantem C_L und konstantem $K_L a$ betrieben, verringern sich die Umsatzraten entsprechend der Zuwachsrate der Biomasse X.

Dieses Feeding-System hat sich vor allem in der Penicillinherstellung bewährt, da hier unter allen Umständen ein Abfallen des gelösten Sauerstoffwertes unter 5 % des Sättigungswertes vermieden werden muß, um eine irreversible Schädigung dieses Biosynthesesystems zu verhindern (102).

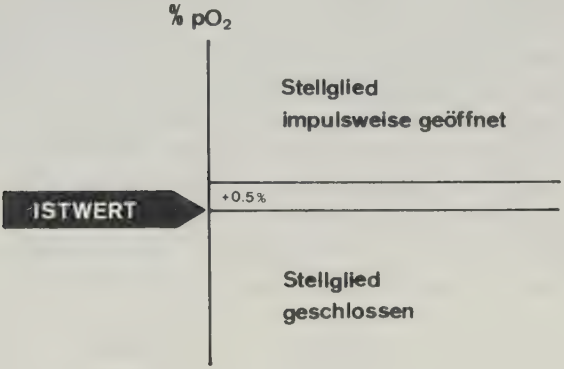


Abb. 72: Tätigkeit des Stellgliedes für Substrat-Feeding in Abhängigkeit zur Sauerstoff-Sättigung im Medium.

Nachteilig auf diesen Regelkreis wirken sich folgende Faktoren aus: Bei Mycel-Fermentationen besteht die Gefahr des Zuwachsens der Sonde, weshalb sich die Verwendung einer Reinigungseinrichtung (vgl. III.4.) oder der Einbau in eine Wechselsonde (vgl. III.3.) empfiehlt. Mit letzterer läßt sich die Sonde zudem nacheichen, was bei längerer Prozeßdauer notwendig werden kann. Durch die enorme rheologische Veränderung des Mediums ist die Messung mit Fehlern behaftet.

3.3. Kontinuierliche Verfahren

Der Ausdruck "kontinuierlich" bezeichnet einen Bioreaktor, der während der gesamten Prozeßdauer mit frischer Nährlösung versorgt wird. Beide Verfahren, der Chemostat wie der Fed-Batch sind daher, in diesem Sinne gesehen, kontinuierliche.

Das Verfahren mit zeitabhängiger Volumenänderung kennzeichnet den Fed-Batch-Reaktor oder einen Bioreaktor mit ungleichen volumetrischen Zufluß- und Abfluß-Raten. Der Ausdruck "Fed-Batch" wurde von YOSHIDA et al. (117) eingeführt.
Der kontinuierliche substratlimitierte, mit konstantem Volumen arbeitende Reaktor oder Chemostat wurde in der Literatur ausführlich diskutiert (53, 67). In diesem System wird durch gleiche volumetrische Zufluß- und Abfluß-Raten das Flüssigkeitsvolumen im Bioreaktor konstant gehalten.
Das Gleichgewicht der Biomasse in der Flüssigphase kann folgendermaßen formuliert werden (38):

$$\begin{bmatrix}\text{Biomasse-}\\ \text{Anreicherungs-}\\ \text{Rate im}\\ \text{Reaktor}\end{bmatrix} = \begin{bmatrix}\text{Biomasse-}\\ \text{Zufluß-}\\ \text{Rate in}\\ \text{Reaktor}\end{bmatrix} - \begin{bmatrix}\text{Biomasse-}\\ \text{Abfluß-}\\ \text{Rate aus}\\ \text{Reaktor}\end{bmatrix} + \begin{bmatrix}\text{Biomasse-}\\ \text{Produktions-}\\ \text{Rate im}\\ \text{Reaktor}\end{bmatrix}$$

In Symbolform, wobei die Zellkonzentration und die volumetrischen Fluß-Raten benutzt werden, läßt sich obige Gleichung für einen gut gemischten Reaktor folgendermaßen schreiben:

$$\frac{d(V\,X_1)}{dt} = F_o \cdot X_o - F_1 \cdot X_1 + r_x \cdot V \qquad (1)$$

Unter der Annahme der üblichen Wachstums-Kinetik ist

$$r_x = \mu \cdot X_1$$

Die Wachstumsrate ist üblicherweise erster Ordnung, bezogen auf die Zellkonzentration, und ist nach der Monod-Relation oder nach Modifikationen von dieser von der Substratkonzentration abhängig:

$$\mu = \frac{\mu_m \, S_1}{K_s + S_1}$$

Das Zell-Gleichgewicht wird:

$$\frac{d(V \cdot X_1)}{dt} = F_o \cdot X_o - F_1 \cdot X_1 + \left(\frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} \right) X_1 \cdot V \qquad (2)$$

V = Arbeitsvolumen
F = volumetr. Flußrate
S = Substratkonzentration
t = Zeit
X = Biomassekonzentration
r = Reaktionsrate
μ = spezifische Wachstumsrate
μ_m = maximale Wachstumsrate
K_s = Sättigungs-Konstante
Y = Ausbeute-Koeffizient
D = Durchflußrate F_o/V

Indices:
0 für Zufluß
1 für Abfluß und Inhalt

3.3.1. Fed-Batch

Ein Fed-Batch wurde definiert als ein Bioreaktor mit Substrat-Zufluß aber ohne Abfluß. Für dieses System lautet die volumetrische Flußrate:

$$\frac{dV}{dt} = F_o \qquad (3)$$

wobei F_o eine Funktion der Zeit sein kann.

Die Gleichung (2) heißt für $X_o = 0$:

$$\frac{d(V \, X_1)}{dt} = \left(\frac{\mu_m \, S_1}{K_s + S_1} \right) X_1 \cdot V \qquad (4)$$

Der Ausdruck $d(V\ X_1)$ kann geschrieben werden als:

$$\frac{dV}{dt}\ X_1 \quad + \quad \frac{dX_1}{dt}\ V$$

Kombination aus (3) und (4) ergibt:

$$\frac{dX_1}{dt} = - \frac{F_o}{V}\ X_1 \quad + \left(\frac{\mu_m \quad S_1}{K_s + S_1} \right) X_1 \qquad (5)$$

Die Gleichungen (3) und (5) liefern das mathematische Modell für den Fed-Batch-Reaktor. In der Arbeit von PIRT (84) sind entsprechende Ableitungen für Produktbildungs-Raten aufgezeichnet. Für $Y_{p/S}$ = konstant ist q_p direkt proportional zur spezifischen Wachstumsrate μ, d.h. in Gleichung (5) müßte X durch P ersetzt werden. Da q_p für Sekundärmetaboliten eher in einer komplexen Weise mit μ variiert, sind die entsprechenden mathematischen Modelle bedeutend aufwendiger (84).

3.3.2. Repeated-Fed-Batch

In einer Repeated-Fed-Batch-Kultur wird jeweils ein Teil der Kultur in zeitlichen Intervallen abgeführt. Dies bedeutet, daß das Kulturvolumen und folglich die Durchflußrate, sowie die von dieser abhängigen metabolischen Parameter, wie die spezifische Wachstumsrate, einer zyklischen Variation unterworfen sind. Für die aufeinanderfolgenden Zyklen können die gleichen Modelle wie für die Fed-Batch-Kultur verwendet werden.

3.3.3. Chemostat

Es ist instruktiv, das Fed-Batch-Modell mit demjenigen für einen Chemostaten zu vergleichen. Für dieses Vorhaben kann das Chemostat-Modell aus den allgemeinen Gleichgewichts-Gleichungen (1) abgeleitet werden:

$$F_o = F_1$$

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad \text{oder} \quad V = \text{konstant}$$

Das Zell-Gleichgewicht für konstantes Volumen und $X_o = 0$ wird:

$$\frac{dX_1}{dt} = -\frac{F_o \; X_1}{V} + \left(\frac{\mu_m \; S_1}{K_s + S_1}\right) X_1 \qquad (6)$$

Die Gleichung (5) ist formell identisch mit der Gleichung (6), aber es ist wichtig zu bemerken, daß die physikalische Bedeutung dieser Ausdrücke nicht identisch ist. Vergleicht man den Ausdruck $-F_oX_1/V$ in Gleichung (5) und in Gleichung (6), kann gezeigt werden, daß dessen Ursprung für den Fed-Batch-Fermenter der Ausdruck $X_1 \cdot dV/dt$ ist; er stellt daher eine Abnahme der Zellkonzentration aufgrund des Volumenzuwachses durch die Zuflußrate F_o dar. Im Chemostaten hingegen ist $-F_oX_1/V$ aus Gleichung (6) ein Ausdruck für das Auswaschen und drückt die Fluß-Rate der Zellen aus, die mit dem Abflußstrom den Reaktor verlassen.
Mathematisch sind die beiden Modelle ebenfalls nicht identisch, weil die Durchfluß-Rate F/V im Chemostaten bei unverändertem Zufluß konstant ist; im Fed-Batch-Fermenter verursacht das kontinuierliche Feeding einen Volumenzuwachs und eine entsprechende Abnahme der Durchfluß-Rate F_o/V. Ein Fed-Batch-Fermenter kann verglichen werden mit einem Chemostaten, dessen Durchfluß-Rate sich langsam verringert.
Da aber die äußere Form des Fed-Batch-Modelles identisch mit der des Chemostaten ist, kann daraus geschlossen werden, daß der Fed-Batch Analogien aufweisen muß. Ein dynamisches Steady-state wird erreicht für eine genügend kleine Durchflußrate, d.h. wenn die spezifische Wachstumsrate exakt gleich der Durchfluß-Rate F_o/V gehalten wird. Dieses Phänomen wurde bereits früher erkannt und das dynamische Steady-state wurde damals "quasi-steady state" genannt (84). Es ist charakterisiert durch einen konstanten Wert von X_1,

der gegeben sein muß, da $\mu = F_o/V$ ist.
Aus Gleichung (4) folgt unter quasi-steady state-Bedingungen

$$\frac{d(V X_1)}{dt} = F_o X_1 = \text{konstant} \qquad (7)$$

Die Zuwachsrate der Gesamt-Biomasse ist konstant.

Aus Gleichung (9) folgt, daß das Volumen linear mit der Zeit zunimmt

$$V = V_o + F_o \cdot t \qquad (8)$$

Die Änderungs-Rate für μ während einer quasi-steady state-Periode ist:

$$d\left(\frac{F_o}{V}\right) = -\frac{F_o^2}{V^2} = -\frac{F_o^2}{(V_o + F_o t)^2} \qquad (9)$$

Bei kleinem t, wenn $V = V_o$ ist, wird

$$\frac{d\mu}{dt} = -\frac{F_o^2}{V_o^2} \qquad (10)$$

Bei höheren Werten von t oder unter der Bedingung $V \gg V_o$ wird:

$$\frac{d\mu}{dt} = -\frac{1}{t^2} \qquad (11)$$

Dies zeigt, daß μ am Anfang des Fed-Batch schneller abnimmt, d.h. die Abnahme-Rate wird langsamer mit der Zeit. Für das Vorhaben, eine bestimmte Abnahme-Rate für μ zu erhalten, kann die Fluß-Rate F_o im Laufe der Fermentation progressiv verändert werden.
Die Gleichgewichts-Gleichung für die Biomasse im Chemostaten ist in der Gleichung (6) aufgezeigt. In der Annahme, die Zunahme μX werde kompensiert durch den Abfluß an Biomasse mit dem Medium DX, ist die Bedingung für das Steady-state notwen-

digerweise:

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{FX}{V} + \left(\frac{\mu_m \; S_1}{K_s + S_1}\right) X = 0$$

$$\frac{F}{V} = D, \qquad \left(\frac{\mu_m \; S_1}{K_s + S_1}\right) = \mu$$

Im Chemostaten ist daher: $D = \mu$

Die Aufrechterhaltung eines gleichbleibenden Wertes von D erfordert daher bezüglich der apparativen Seite Einrichtungen, die sowohl für ein konstantes F wie ein konstantes V garantieren. Einzelheiten sind in den Abschnitten III.8.2.2. und III.8.4. aufgeführt.

4. Gateway-Sensoren

Von besonderer Bedeutung bei Fermentationen ist die Ermittlung nicht direkt meßbarer Variablen, die durch Kombination meßbarer Größen in Form von mathematischen Modellen erfolgt. Sensoren, die diese Meßgrößen liefern, nennt HUMPHREY (57) "Gateway"-Sensoren, da sie den Weg öffnen, um zusammen mit Meßdaten anderer Sensoren weitere Informationen über den Fermentationsablauf zu erhalten.
Die Reduktion von Meßdaten, wie sie in Tabelle 6 dargestellt ist, gibt sowohl einen Einblick in die physikalisch-chemischen, wie in die physiologischen und biochemischen Bedingungen des Prozesses. So läßt sich z.B. aus dem pH-Wert in Verbindung mit einer differentiellen und integrierten Messung der Zugabemengen an Korrekturlösungen die Rate der Produktbildung folgern. Um die Verbrauchsrate von Sauerstoff zu bestimmen, muß man die Meßwerte der O_2-Konzentration in der Abluft mit denen der Zuluft sowie der Belüftungsrate in Beziehung setzen. Die Entwicklungsrate des CO_2 kann in einer analogen Weise bestimmt werden. Aus der CO_2-Entwicklungsra-

Tabelle 6: Gateway-Sensoren (57)

pH	———	Säurebildung
Gelöst-Sauerstoff	———	O_2-Übergangsrate
O_2 in Abluft / Luftvolumen	> ———	O_2-Verbrauch
CO_2 in Abluft / Luftvolumen	> ———	CO_2-Entwicklung
O_2-Verbrauch / CO_2-Entwicklung	> ———	Respirationsquotient
Zucker-Level / Feeding / CO_2-Entwicklung	> ———	Ausbeute und Biomasse

te und der O_2-Verbrauchsrate kann der Respirationsquotient berechnet werden. Dieser Quotient ist ein sehr wichtiger Indikator für die Zell-Aktivität. Wird ein Fermenter mit einem konstanten Luftvolumen belüftet, so findet man, daß der Luftstrom der Zuluft und der Abluft nur identisch ist, wenn das entwickelte CO_2-Volumen durch das verbrauchte O_2-Volumen kompensiert wird, d.h. wenn $Q_{O_2} = Q_{CO_2}$ ist.

Ist diese Bedingung nicht erfüllt, treten durch die Volumenänderung des Luftstromes beachtliche Abweichungen von den wahren Werten auf. In einer Arbeit von FIECHTER et al. (42) sind die Formeln für diese Korrekturberechnungen aufgeführt.

REUSS (89) zeigt ein Modell, das die Ermittlung der Zellmasse ermöglicht. Das Modell basiert auf der Sauerstoff-Bilanz in der Gasphase:

$$Q_{O_2} X = V_L (c^{\alpha}_{O_2} - c^{\omega}_{O_2}) \qquad (1)$$

(Q_{O_2} spezifische O_2-Aufnahmerate, X Zelldichte, $c^{\alpha,\omega}_{O_2}$ Ein- bzw. Austrittkonzentration des Sauerstoffs, V_L Volumenstrom der Luft)

sowie dem Ansatz:

$$Q_{O_2} X = Q^m_{O_2} X + \frac{1}{Y_{x/o}} \frac{dX}{dt} \qquad (2)$$

($Q^m_{O_2}$ Erhaltungskoeffizient, $Y_{x/o}$ Ausbeute g Zellmasse/g O_2)

Gleichung (2) impliziert die Annahme, daß sich die Sauerstoff-Aufnahmerate additiv zusammensetzt aus einem Term für die Aufrechterhaltung der Zellstruktur sowie einem Term, der direkt proportional zum Wachstum der Zellen ist. Bei Kenntnis der Parameter $Q^m_{O_2}$ und $Y_{x/o}$ kann man die Differentialgleichung (2) lösen und die Biomasse X berechnen.

V. DISKUSSION

Die meisten industriellen Fermentationsverfahren erfordern eine Manipulation der Physiologie des Produzentenstammes zur Stimulierung der Produktion von Primär- oder Sekundärmetaboliten oder von Enzymen. Die Stoffwechselaktivität des Organismus unterliegt sowohl der Kontrolle des Genotyps wie der Umwelteinflüsse, sodaß sich für eine Manipulation die Möglichkeit ergibt, entweder den Genotyp oder die Umweltfaktoren, oder beide zusammen, zu verändern (vgl. Abb. 73).

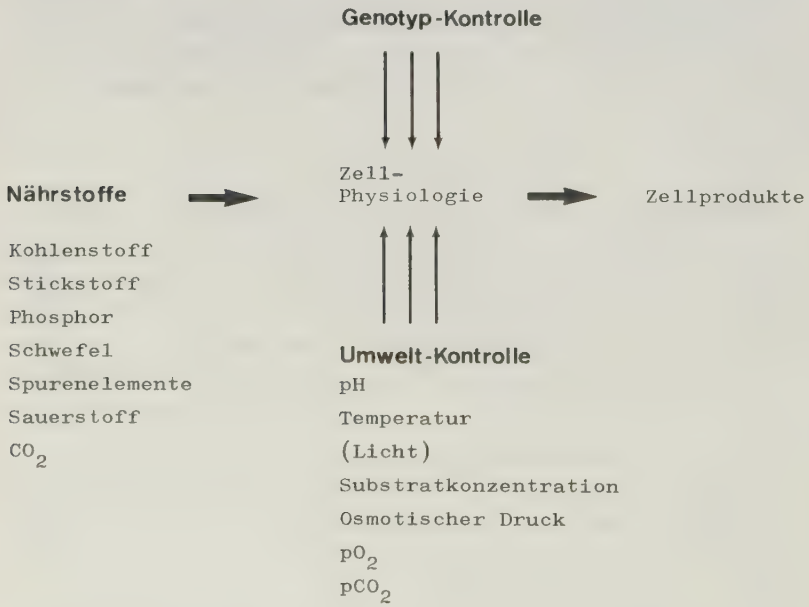


Abb. 73: Diagramm zur Illustration der Beziehung zwischen genetischer und umweltbezogener Kontrolle des mikrobiellen Stoffwechsels (13,variiert).

Verfahrensoptimierungen auf der Basis genetischer Eingriffe sollen hier nicht näher erläutert werden, was aber keineswegs als Wertminderung dieser Techniken aufzufassen ist. Für viele Prozesse sind sie die Methode der Wahl; man denke an die Verwertung ausgefallener oder unnatürlicher Substrate oder an Biosynthesewege mit Feedback-Hemmung durch einen Intermediärmetaboliten oder das Endprodukt.
Viele der jüngsten Fortschritte in der Fermentationstechnologie beruhen auf einer Verbesserung des Fermenter-Design und somit auf einer Steigerung des Homogenitätsgrades in der Kultur, sowie auf einem allgemein höheren Kontroll-Level der Prozesse. Doch dies soll nicht über die Tatsache hinwegtäuschen, daß der Fermenter nach wie vor nur ein Instrument bleibt, das dem Operateur erlaubt, den Zustand des Kulturmediums zu überwachen. Es ist der Zustand dieses Mediums (pH, Temperatur, qualitative und quantitative Nährlösungszusammensetzung und Belüftungsgrad), der das Wachstum des Organismus beeinflußt. Zur Diskussion steht daher die Manipulation oder Lenkung des Stoffwechsels in eine bestimmte Produktionsrichtung auf der Basis der Umwelteinflüsse bzw. der Prozeß-Parameter.
Dazu ist es wichtig, den Sekundärstoffwechsel unter dem Gesichtspunkt zu sehen, daß er, abgesehen von Regulationseffekten einzelner Reaktionsschritte, einer Gesamtregulation unterworfen ist, die spezifisch mit dem Wachstum korreliert (27). Die beiden Aktivitäten, Sekundärstoffwechsel und Wachstum, sind oft komplementierende Alternativen, die aber um Schlüssel-Intermediärmetaboliten wie Acetyl-CoA, Malonyl-CoA, α-Ketoglutarat, Oxalacetat etc. konkurrieren. Damit soll aber nicht gesagt werden, wie oft vermutet wird, daß Wachstum und Sekundärmetabolismus sich gegenseitig ausschließen. Doch zur Erklärung dieser Wechselwirkung ist es zweckmäßig, erst zu präzisieren, was man üblicherweise unter "Wachstum" versteht. Viele Mikrobiologen und speziell Bakteriologen setzen den Begriff "Wachstum" mit den Selbstreproduktions-Eigenschaften des Organismus gleich und zählen daher ihre Zellen in den Kulturen; sie benützen dies als ein

Maß für die Multiplikation des primären genetischen Materials und des damit verbundenen Apparates für die Biopolymer-Synthese. Die Bedenken gegen die Verwendung der Zellzahl in dieser Art sind bekannt, sind aber nicht immer von entscheidender Bedeutung. Wachstumsuntersuchungen wurden daher zum größten Teil mit Bakterien und zu einem kleineren Teil mit Hefen durchgeführt. Mycelbildende Pilze wurden, aus verständlichen Gründen, übergangen. Sie wachsen im Vergleich mit vielen Bakterien langsam und benötigen daher für die Experimente einen größeren Zeitaufwand. Die Morphologie ihrer Wachstumsform, üblicherweise als Filamente, flächenartige Gebilde oder Pellets, erschwert zudem ihre Handhabung. Überdies neigen sie zur Differenzierung, sodaß manchmal multizelluläre Strukturen beachtlicher Komplexität entstehen.
Eine Vorbedingung für quantitative Studien ist ein Verständnis der Art und Weise, wie neues Mycel gebildet wird. Die Zunahme an Bakterien- oder Hefemasse zeigt sich normalerweise in einer Zunahme an Länge und Durchmesser der Zelle und in einer darauffolgenden Teilung, so daß das Zellvolumen nur über ungefähr einen zweifachen Bereich variiert. Bei mycelbildenden Pilzen bedingt das Wachstum einen Längenzuwachs der Hyphe über einen bedeutend größeren Bereich. Exponentielles Wachstum besagt aber, daß die gesamte oder ein gleichbleibender Anteil der Hyphenlänge am Wachstum beteiligt sein muß. Dies kann durch eine Verästelung der Hyphe erreicht werden. Verschiedene Arbeiten (93) bestätigten die Hypothese, daß: 1. das Längenwachstum an der Spitze kurzer Hyphen sowohl proportional zur Hyphenlänge wie zur Wachstumsrate ist, d.h. daß kurze Hyphen exponentiell wachsen; 2. jede Hyphe eine Zuwachsrate aufweist, die sich zwischen einem minimalen und einem maximalen Wert bewegt, wobei letzterer als Organismenkonstante gilt; und 3. sobald die Kapazität für das Längenwachstum der bestehenden Hyphenspitze überschritten wird, eine neue Verzweigung entsteht. Daraus folgt, daß die Verzweigungs-Häufigkeit proportional zur spezifischen Wachstumsrate ist.
Die maximale Wachstumsrate ist dann erreicht, wenn sie durch

die dem Organismus eigene Charakteristik und nicht durch eine Substratkonzentration begrenzt wird. Eine Reduktion der Wachstumsrate kann durch Limitierung irgend eines essentiellen Substrates erwirkt werden (vgl. Monod-Gleichung unter IV.3.). Unter diesen Bedingungen ist das Wachstum nicht mehr ausgeglichen (balanced) und Nährstoffe werden in Stoffwechselwege geschleust, die für das Wachstum nicht essentiell sind. Die Stoffwechselwege, die bei maximaler Wachstumsrate in Erscheinung treten, werden als primäre bezeichnet im Gegensatz zu den sekundären, die bei sub-maximaler Wachstumsrate auftreten oder mindestens aktiver werden. Welcher dieser sekundären Stoffwechselwege aktiv wird, ist sowohl vom Organismus (Genotyp) wie von der Art des limitierenden Substrates abhängig (13).
Quantitative und regulatorische Aspekte über die Enzymologie von Sekundär-Biosynthesen sind kaum erforscht; vor allem die Vielzahl von Reaktionen, die in einer solchen Studie zu untersuchen sind (und die vergleichsweise geringe Bedeutung einer Einzelreaktion), haben gewiefte Enzymologen vor dem Risiko, in das Gebiet der Sekundärmetaboliten einzusteigen, abgehalten. Aufgrund der spärlichen Daten, die über Regulationsmechanismen des Sekundärstoffwechsels vorliegen, ist es schwierig, allgemein gültige Aussagen zu machen. Aus allgemeinen Beobachtungen kann man schließen, daß die gesamte Kinetik des Primärstoffwechsels durch den Substratlevel reguliert wird, da die Enzyme normalerweise im Überschuß vorliegen, wohingegen der Sekundärstoffwechsel größtenteils enzymlimitiert ist (27). Dies ist teilweise eine Folge der Position, die der Sekundärstoffwechsel im Gesamthaushalt der Zelle einnimmt, sowie der Art und Weise, wie sich dieser vom Netzwerk des primären abzweigt. Unter diesem Gesichtspunkt ist auch eine Limitierung des Sekundärstoffwechsels durch den Pool eines bestimmten primären Metaboliten zu sehen, um den beide Aktivitäten konkurrieren. Im Falle der Ergot-Alkaloid-Synthese bei einem Claviceps purpurea Stamm ist Tryptophan (primärer Metabolit) ein Effektor für die Enzyme dieser sekundären Biosynthese, unabhängig davon,

ob der intrazelluläre Tryptophan-Pool von außen durch Tryptophan-Zugabe oder intrazellulär reguliert wird. Doch auch hier kommt der Induktionseffekt des Tryptophans nur bei limitiertem Wachstum zum Ausdruck (45). Es scheint daher, daß dem Pool eines sogenannten Schlüssel-Intermediärmetaboliten eine wichtige regulatorische Funktion (als Effektor oder Precursor) im Sekundärstoffwechsel zukommt und daß dieser Pool wachstumskontrolliert ist.

Der Sekundärstoffwechsel in einer Kultur wird nicht bloß durch die Existenz einer Wachstumslimitierung bestimmt, sondern hauptsächlich durch deren Intensität. Ebenso ist es für den Organismus bedeutsam, welche der Substratkomponenten limitierend ist (27). Zur Limitierung der Wachstumsrate bieten sich verschiedene Methoden an; sie sind unter IV.3. aufgeführt. So können als C-Quelle schnell abbaubare Monosaccharide in limitierender Menge mittels eines Feeding- oder kontinuierlichen Systems zudosiert werden, oder es können Oligosaccharide und Polysaccharide vorgelegt werden, die, aufgrund der vorangehenden hydrolytischen Spaltung, nur langsam und somit wachstumsbegrenzend metabolisiert werden.

Bis anhin wurde behauptet, das "natürliche" Wachstum von Mikroorganismen sei exponentiell und Abweichungen davon beruhten auf einer Limitierung an verfügbarem Substrat, das für das Wachstum benötigt wird. Es wurde hingegen immer wieder gezeigt, daß eine Anpassung der Wachstumskurve eines Pilzes an die Kurve aus der Kubikwurzel der Biomasse eindeutig besser war als an deren logarithmische (93):

$$X^{1/3} = X_o^{1/3} + kt \qquad (1)$$

Dieser scheinbare Konflikt wurde von PIRT (83) gelöst, indem er zeigen konnte, daß sich das "Kubikwurzel"-Wachstum auf pelletartiges Wachstum bezieht. Sobald das Pellet einen bestimmten Durchmesser überschreitet, kann das Substrat nicht so schnell ins Innere diffundieren, um im gesamten Pellet ein unlimitiertes Wachstum aufrechtzuerhalten. Dies läßt sich damit erklären, daß die Pellet-Masse proportional zur

dritten Potenz ihres Radius ist, die Oberfläche, durch die das Substrat diffundieren muß, hingegen nur mit dem Quadrat des Radius wächst. Ab einer bestimmten Größe wird daher nur noch eine periphere Schicht mit genügend Substrat für ein exponentielles Wachstum versorgt (56, 82, 83, 116). Annähernd läßt sich sagen, daß das Pellet innerhalb der exponentiell wachsenden peripheren Schicht, d.h. im Zentrum des Pellets, überhaupt nicht wächst (71, 82, 83, 93). Die Zuwachsrate läßt sich somit folgendermaßen ausdrücken:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X_p \qquad (2)$$

wobei X_p die Masse der peripheren Wachstumszone des Pellets darstellt und:

$$\frac{dR}{dt} = \mu_m \omega \qquad (3)$$

$$R = \mu_m \omega t + R_o \qquad (4)$$

wobei R der Radius des Pellets und ω die Tiefe der peripheren Wachstumszone ausdrückt; ω ist für jede wachstumlimitierende Substratkonzentration eine charakteristische Konstante (93).
Die Masse eines Pellets der Dichte ρ_m ist gegeben durch:

$$X = \frac{4}{3} R^3 \pi \rho_m \qquad (5)$$

Eine Substituierung von R in Gleichung (4) ergibt:

$$X^{1/3} = \left(\frac{3}{4 \pi \rho_m} \right)^{-1/3} \mu \omega t + X_o^{1/3} \qquad (6)$$

$(3/4\pi\rho_m)^{-1/3}$ ist eine Konstante und numerisch gleich 0.74, wenn die Pellet-Dichte mit 0.1 g Trockenmasse/cm^3 angenommen wird (83). Daher folgt das Wachstum eines einzelnen Pellets oder einer größeren Anzahl Pellets gleichen Durchmessers der Kurve aus der Kubikwurzel der Biomasse, insofern

R größer als ω ist, bei R kleiner als ω, ist das Wachstum exponentiell. Mikroskopische Untersuchungen von dichten Pellets zeigten, daß deren Inneres tot ist. Vor allem dann, wenn der Pellet-Radius erheblich größer als die periphere Wachstumszone ist, wird die Kultur physiologisch heterogen. Für Stoffwechseluntersuchungen ist es daher wünschenswert, pelletartiges Wachstum weitgehend zu verhindern (93).
Die Pellet-Bildung tritt bei sehr enger Verästelung der Hyphen auf (93). Wenn Hypenbrüche proportional zur Hyphenlänge sind, umso geringer ist bei längeren Internoden und bei mehr Einzelhyphen die Wahrscheinlichkeit zur Pellet-Bildung, oder anders ausgedrückt: Je kürzer die Internode sind oder je größer die Verzweigungshäufigkeit ist, desto dichter wird das Pellet. Da die Verzweigungshäufigkeit mit der Wachstumsrate zunimmt, tritt Pellet-Bildung besonder bei hohen Wachstumsraten auf. Es sind hingegen noch andere Faktoren bekannt, welche die Pellet-Bildung beeinflussen: pH, Metallionen, Scherkräfte, komplexes oder definiertes Medium (93,99).
Die Wachstumsform als Pellet hat einen enormen Einfluß auf die rheologischen Eigenschaften der Kulturflüssigkeit; die Viskosität ist geringer als bei einer entsprechenden Konzentration filamentöser Pilze, wodurch eine bessere Durchmischung und höhere Transfer-Raten erzielt werden können. Hingegen sind die Diffusionsstrecken vom Medium in die Hyphe bei Pellets bedeutend größer als bei Filamenten (vgl. IV. 2.3.2.).
Das Phänomen, daß Kulturen bei gleichen Bedingungen (Medium, pH, Temperatur und Belüftungsrate) in verschiedenen Schüttelkolben-Typen oder in Fermentern mit verschiedenen Rührsystemen (Blattrührer, Intensor) zum Teil extrem unterschiedliche Produktionsraten aufweisen, dürfte wahrscheinlich in der unterschiedlichen Morphologie der einzelnen Kulturen liegen. So ist bei pelletartigem Wachstum die Limitierung weniger eine Funktion der Substrat-Konzentration (C- und N-Quelle, pO_2, pCO_2) als vielmehr der -Diffusion ins Pellet-Innere. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß eine defi-

nierte Prozeßüberwachung nur möglich ist, wenn man diese Art der Limitierung ausschließen bzw. konstant halten kann, was sich durch filamentöses Wachstum bzw. durch gleichbleibende Pelletgröße erreichen läßt; bei intensiv gerührten Fermentern kann der Pelletdurchmesser aufgrund der Scherkräfte einen bestimmten maximalen Wert nicht überschreiten (23, 71, 72).

Die Reaktionsmöglichkeiten von Pilzkulturen auf Umwelteinflüsse sind extrem vielfältig, da jede Spezie als einen einmaligen Spielraum für Reaktionen, vor allem in Bezug auf Differenzierung und Sekundärmetaboliten-Bildung, angesehen werden kann. Batch-Kulturen zeigen zu Beginn üblicherweise eine Periode unlimitierten Wachstums, aber der progressive Verbrauch an Substrat führt zwangsläufig in und durch ein Spektrum zunehmender Limitierung. Unter diesen Bedingungen wird die Geschwindigkeit, mit der die Wachstumsrate abfällt, durch das limitierende Restsubstrat oder die Pelletgröße (vgl. Monod-Gleichung IV.3. bzw. IV.2.3.2.) bestimmt. Die stetige Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit bewirkt ein unausgeglichenes Wachstum, d.h. es setzt eine Zelldifferenzierung ein. Das Mißverhältnis zwischen dem statischen Charakter des Mediums und dem dynamischen Verhalten der Kultur im Batch-Prozeß resultiert in einer typischen Wachstumskurve (oder auch in der Produktionskurve). Der Sekundärstoffwechsel kann daher als Ausdruck der Zelldifferenzierung angesehen werden (27).

In wachsendem Mycel sind die Hyphenspitzen "jung" und von diesen entferntere Teile progressiv älter. Es ist bekannt, daß die verschiedenen Hyphenpartien teilweise drastische morphologische und physiologische Unterschiede aufweisen. Für jede einzelne Wachstumsrate ist das Verhältnis dieser Differenzierungsgrade eine Konstante, da Längenwachstum, Brüche und Verästelungsfrequenz der Hyphe mit der spezifischen Wachstumsrate korrelieren. Die Entwicklung einer Batch-Kultur kann daher als eine stete Veränderung dieses Verhältnisses gesehen werden. Das Alter des Mycels kann weitgehend durch den Differenzierungsgrad ausgedrückt werden, wobei

aber beachtet werden muß, daß nicht alle Differenzierungsschritte reversibel sind, so z.B. die einsetzende Sporulierung. Allgemein kann man sagen, daß jedes Transient-Verhalten einer Batch-Kultur, das sich in einem Chemostaten aufrechterhalten läßt, reversibel ist (24).
Aufgrund der mit der Wachstumsrate einhergehenden Differenzierung bereitet die Bestimmung ersterer Schwierigkeiten. Mit der Biomasse - üblicherweise als Trockengewicht - umfaßt man alle Prozesse, die zum Zellmaterial beitragen: die Grundreplikations-Systeme für Nukleinsäuren und Proteine wie die assimilatorischen (Reservestoffe). Es empfiehlt sich daher, selektivere Bestimmungsmethoden anzuwenden: Bestimmung des Nukleinsäure-, Protein-, Stickstoff-Gehaltes oder unlösliches Gesamtmycel (27).
Das Ziel für effiziente Produktionsprozesse sollte darin bestehen, die autosynthetischen Prozesse des Organismus auf die Reproduktion des Systems (das "Minimal-System") zu beschränken, das die gewünschte Funktion ausübt (36). Das heißt mit anderen Worten, man müßte den Organismus auf den für die jeweilige Produktion günstigsten Differenzierungsgrad bringen und diesen Zustand möglichst lange aufrechterhalten. Beim üblichen Batch-Prozeß beträgt die Produktionsphase - sie soll nicht als ein Begriff wie z.B. die Wachstumsphase gelten, sondern als Periode mit einer für die Produktbildung günstigen Differenzierung - oft nur 10 bis 30 % der gesamten Prozeßdauer. Mit den verschiedenen Feeding-Systemen (vgl. IV.3.) läßt sich die Produktionsphase erheblich verlängern, wobei die Produktionsrate aber variieren kann. Das einzige Verfahren, um das oben erwähnte Ziel annähernd zu erreichen, ist der kontinuierliche Prozeß.
Es ist erstaunlich, wie primitiv heute noch die industrielle Produktion mikrobiologischer Produkte gehandhabt wird. Es läßt sich teilweise damit erklären, daß einerseits bestehende Anlagen weiterhin benützt werden müssen und andererseits bei eingeführten Produkten keine Konkurrenz besteht, die zu rationelleren Verfahren zwingt. Es ist eine wohlbekannte Tatsache, daß kontinuierliche Verfahren bedeu-

tend fundiertere Kenntnisse der gesamten Prozeß-Kinetik voraussetzen als dies für Batch-Ansätze zutrifft. Es sollten daher, um die Prozeß-Kinetik zu erarbeiten, bereits die Forschungs- und Entwicklungs-Labors mit kontinuierlichen Fermenteranlagen ausgerüstet werden.
Die Daten, welche die Gateway-Sensoren (IV.4.) liefern, lassen unter Umständen Schlüsse auf einzelne Stoffwechselwege ziehen (39, 46, 55, 57, 77, 81, 111), geben aber zu jedem Zeitpunkt Auskunft über den Entwicklungsstand des Prozesses. Der enorme Anfall von Daten dieser Sensoren und aus den übrigen Analysen (vgl. z.B. III.9.1.3.) erfordern zu deren Bewältigung den Einsatz eines Computers, speziell zur Ermittlung von Prozeßtendenzen (46, 57, 89). Die Siganle der Gateway-Sensoren erfordern häufig eine Korrektur, bevor sie als Regelsignale eingesetzt werden können (vgl. IV.4.), d.h. sie können nicht direkt auf einen Analog-Regler gegeben werden. Hier wäre der Einsatz eines Prozeß-Rechners angebracht, der gleichzeitig diese Korrekturen vornehmen und den Prozeß direkt (on-line) überwachen kann. Wie HUMPHREY (57) und andere Autoren (46, 89) ausführten, ist die Zeit für den Computer-Einsatz in der Biotechnologie r e i f.
Bedenkt man der enormen Fortschritte, welche nur auf die Messung und Überwachung des gelösten Sauerstoffes in Fermentationsprozessen zurückzuführen sind (4, 32, 36, 40, 60, 102, 103, 119), ist die Notwendigkeit hochinstrumentierter Fermenter-Einheiten klar ersichtlich. Ein ähnlicher Schritt nach vorne dürfte dann eintreten, wenn es gelingt, das gelöste CO_2 - das sowohl als Inhibitor (36, 64, 76, 77, 85) als auch als Substrat (13) fungieren kann - einfach zu erfassen (vgl. III.9.3.) und zu überwachen.
Die Zukunft der Prozeß-Optimierung liegt aber keineswegs nur in einer verbesserten Technologie, sondern ein Verfahren gilt dann als optimiert, wenn sowohl seine genetische, physiologische wie technologische Seite untersucht und verbessert ist. Der Umfang dieses Aufgabengebietes ruft zwangsweise nach einem Team von Genetikern, Biochemikern, Biologen und Ingenieuren, wobei Prioritäten für jeden Prozeß in-

dividuell festzusetzen sind.
Dem oben skizzierten optimalen Fermentationsprozeß steht der Zwang gegenüber, Mikroorganismen zu fermentieren, über die so gut wie nichts bekannt ist. Geht es darum, von Stämmen, die direkt aus dem Screening-Programm kommen, die ersten Substanzmengen, die zur Identifikation, Strukturaufklärung oder Vorversuchen benötigt werden, zu produzieren, soll dies im einfachen Fermenter, der ohne weitere Vorarbeiten gefahren werden kann, erfolgen. Dazu verwendet man vorzugsweise Medien, wie sie in Screening-Programmen Anwendung finden (8).

ZÄHNER (118) hat in seinem Vortrag auf die Gefahren biotechnologischer Prozesse hingewiesen: Neben den Allergien, die besonders Sporen der Produzentenstämme beim Menschen auslösen und der Pathogenität, die solche Stämme unter den zum Teil unnatürlichen Produktionsbedingungen entwickeln können, erwähnte er die starke Umweltbelastung biotechnologischer Prozesse. Neben dem gewünschten Produkt fallen bei einer Fermentation häufig auch unerwünschte und zum Teil toxische Metaboliten an, die alle (meistens unbewußt) in die Abwässer gelangen. Diese Gefahren ließen sich durch folgende Vorkehrungen stark reduzieren: 1. Verwendung definierter Medien, denn auf den komplexen Substraten, wie sie üblicherweise eingesetzt werden, wachsen die Kulturen zu schnell, was zur Pellet-Bildung führen kann (93). Damit wird zwar in kurzer Zeit eine hohe Biomasse erzeugt, von der aber nur ein geringer Anteil (vgl. Gleichung 2) in der anschließenden "Produktionsphase", die durch irgend ein Feeding-System aufrechterhalten wird, aktiv ist. Zudem beeinträchtigt die so bedingte hohe Viskosität die Transfer-Mechanismen in der Kultur (vgl. Abb. 67 und IV.2.4.). Komplexe Medien enthalten, wie der Name dies ausdrückt, eine Unmenge von Substratkomponenten, die für die Bildung des gewünschten Produktes absolut überflüssig sind. Sie sind aber nicht nur als Ballast, der anschließend die Abwässer belastet, zu sehen, sondern diese Substanzen sind auch Vorstufen für die oben erwähnten unerwünschten Produkte. 2. Durch Optimierung der Produktionsprozesse in dem Sinne, daß die Produktion auf dem für das ge-

wünschte Produkt optimalsten Differenzierungsgrad erfolgt. Dadurch ließe sich die Bildung unerwünschter Metabolite reduzieren, denn jeder Metabolit hat für seine Bildung einen anderen Differenzierungsgrad (4, 27, 45, 96). Gleichzeitig ließe sich so die spezifische Ausbeute, d.h. das Verhältnis vom eingesetzten Substrat zu gebildetem Produkt, erhöhen, da ein geringerer Anteil des Substrates durch Bildung unerwünschter Produkte verloren ginge. 3. Durch Einführung effektiverer Prozesse, hier sind besonders die kontinuierlichen anzuführen (53, 67),könnte das gesamte Fermentervolumen und somit die Abwässermengen reduziert werden. Der Einsatz kleinerer Fermenter-Einheiten (max. 60 m^3) brächte zusätzlich den Vorteil, daß Anlagen dieses Volumens noch homogen gemischt werden können (3, 23, 44, 48, 101, 109, 119). Wenn alle diese Punkte beachtet würden, müßten die Produktionsanlagen der einzelnen Firmen in Zukunft nicht mehr in Mittelmeer-Länder oder Entwicklungsländer verlegt werden, wo man keine oder leicht zu umgehende Umweltauflagen vorfindet.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Auf den allgemeinen Grundlagen der Meß- und Regelungstechnik wurden die speziellen Überwachungssysteme, wie sie in der heutigen Fermentationstechnologie anzutreffen sind, aufgebaut. Besonderes Gewicht wurde auf die Meß- und Regel-Charakteristiken der einzelnen Regelkreise gelegt und diese anhand eines Fermenter-Typs, der am Institut gebaut wurde, diskutiert.
Als apparative Neuheiten, die im Eigenbau gefertigt wurden, sind aufzuführen: Anstechnadel, verstellbare Antischaum-Sonde, in-situ-Reinigung für pO_2-Elektrode und Niveau-Regelung. Ebenso erfolgten Erstbeschreibungen folgender Systeme: Probenahmesystem, Impuls-Geber und -Registrierung, Starttaste zur Überbrückung der Anlaufphase bei pO_2-Feeding und Wellrohr-Fermenter.
Auf der Basis der Substrat-Limitierung wurden verschiedene Kontroll-Systeme vorgestellt und im Hinblick auf deren regulatorische Effekte für den Sekundärstoffwechsel diskutiert.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. AGUILERA, J.M., J. CHIRIFE, J.M. FLINK and M. KAREL: Computer simulation of non enzymatic browning during potato dehydration. Lebensm.-Wiss. und Technol. 8, 128-133 (1975)

2. AIBA, S. and S.Y. HUANG: Some considerations on the membrane covered electrode. J. Ferment. Technol. 47, 372-381 (1969)

3. AIBA, S., A.E. HUMPHREY and N.D. MILLIS: Biochemical Engineering, sec. Ed., eds. S. Aiba, A.E. Humphrey and N.F. Millis (Academic Press, New York, London, 1973)

4. AIBA, S., S. NAGAI and Y. NISHIZAWA: Fed batch culture of Saccharomyces cerevisiae:A perspective of computer control to enhance the productivity in baker's yeast cultivation. Biotechnol. Bioeng. 18, 1001-1016 (1976)

5. AIBA, S.and K. TODA: An analysis of bacterial spores thermal death rate. J. Ferment. Technol. 43, 527 (1965)

6. AIBA, S. and T. YAMADA: Oxygen absorption in bubble aeration, Part 1. J. Gen. Appl. Microbiol. 7, 100 (1961)

7. ANDEREGG, P. and H. NEUKOM: Formation of dehydration products from pentoses and purine ribosides by heating in buffer at pH 2-7. Lebensm.-Wiss. und Technol. 7, 239-241 (1974)

8. AUDEN, J., J. GRUNER, J. NÜESCH and F. KNÜSEL: Some statistical methods in nutrient medium optimalisation. Path. Microbiol. 30, 858-866 (1967)

9. BALZERS, Katalog Band 1, Hochvakuum, Balzers Hochvakuum GmbH, Wiesbaden (1977)

10. BANDYOPADHYAY, B., A.E. HUMPHREY and H. TAGUCHI: Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. Biotechnol. Bioeng. 9, 533-544 (1967)

11. BAYER, P.: Erhöhung des Wachstums bei mikrobiologischen Prozessen. Flugschrift der Giovanola Frères SA, Monthey, Schweiz (1976)

12. BENNETT, G.F. and L.L. KEMPE: Oxygen transfer mechanims in the gluconic acid fermentation by Pseudomonas ovalis. Biotechnol. Bioeng. 6, 347-360 (1964)

13. BERRY, D.R.: The environmental control of the physiology of filamentous fungi, in: The filamentous fungi, eds. J.E. Smith and D.R. Berry (Edward Arnold Limited, London, 1975) p. 16-32

14. BLAKEBROUGH, N. and K. SAMBAMURTHY: Mass transfer and mixing rates in fermentation vessels. Biotechnol. Bioeng. 8, 25-42 (1966)

15. BOBBIO, F.O., P.A. BOBBIO and L.M.V. TREVISAN: Maillard reaction II: Catalytic effect of anions. Lebensm.-Wiss. und Technol. 6, 215-218 (1973)

16. BOMAR, M.T.: Chemische Sterilisation des Fermentationsmediums mit Sorbinsäure. Lebensm.-Wiss. und Technol. 7, 53-56 (1974)

17. BORZANI, W. and M.L.R. VAIRO: A simple device for level control improvement in small-scale continuous fermenters. Biotechnol. Bioeng. 14, 279-280 (1972)

18. BRANTIGAN, J.W., V.L. GOTT, M.L. VESTAL, G.J. FERGUSON and W.H. JONSTON: A non thrombogenic diffusion membrane for continuous in vivo measurement of blood gases by mass spectrometry. J. Appl. Physiol. 28, 375-377 (1970)

19. BRANTIGAN, J.W., V.L. GOTT and M.N. MARTZ: A teflon membran for measurement of blood and intramyocardial gas tension by mass spectroscopy. J. Appl. Physiol. 32, 276-282 (1972)

20. BRIGGS, R. and M. VINEY: The design and performance of temperature compensated electrodes for oxygen measurements. J. Sci. Instrum. 41, 78-83 (1964)

21. BROWN, D.E. and A.R. PATEL: Control of culture mass in a chemostat. Biotechnol. Bioeng. 13, 335-336 (1971)

22. BRUNNER, H. and M. RÖHR: Novel system for improved control of filamentous microorganisms in continuous culture. Appl. Microbiol. 24, 521-523 (1972)

23. BRYANT, J.: The characterization of mixing in fermenters, in: Advances in Biochemical Engineering, vol. 5 , eds. T.K. Ghose, A. Fiechter and N. Blakebrough, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 19

24. BÜHLER, H.: Grundlagen und Probleme der pH-Messung. G-I-T-Fachz. Lab. 7/8, 653-662 (1975)

25. BÜHLER, H. und W. INGOLD: Messung von pH und O_2 in Fermentern. G-I-T-Fachz. Lab. 9, 977-984 (1976)

26. BULL, A.T.: Oxygen availability and the growth of filamentous fungi. J. Appl. Chem. Biotechnol. 26, 47-48 (1976)

27. BU'LOCK, J.D.: Secondary metabolism in fungi and its relationships to growth and development, in: The filamentous fungi, eds. J.E. Smith and D.R. Berry (Edward Arnold Limited, London, 1975) p. 33-58

28. BUNGAY, H.R., W.J. WHALEN and W.M. SANDERS: Microprobe techniques for determining diffusivities and respiration rates in microbial slime systems. Biotechnol. Bioeng. 11, 765-772 (1969)

29. BYLINKINA, E.S. and V.V. BIRUKOV: The problem of scale-up in antibiotic biosynthesis. Proceedings of the 4th int. Fermentation Symp. (1972), p. 105-115

30. CAMMAN, K.: Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden. ed. K. Camman (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973).

31. CHRISTOFORIDES, C., L.H. LAASBERG and J. HEDLEY-WHYTE: Effect of temperatur on solubility of O_2 in human plasma. J. Appl. Physiol. 26, 56-60 (1969)

32. CLARK, L.C., R. WOLF, D. GRANGER and Z. TAYLOR: Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. J. Appl. Physiol. 6, 189-193 (1953)

33. COOPER, C.M., G.A. FERNSTROM and S.A. MILLER: Performance of agitated gas-liquid contactors. Ind. Eng. Chem. 36, 504 (1944)

34. DEINDOERFER, F.H. and A.E. HUMPHREY: Analytical method for calculating heat sterilization times. Appl. Microbiol. 7, 256-264 (1959)

35. DEINDOERFER, F.H. and A.E. HUMPHREY: Scale-up of heat sterilization operations. App. Microbiol. 9, 134-139 (1961)

36. DEMAIN, A.L.: Cellular and environmental factors affecting the synthesis an excretion of metabolites. J. Appl. Chem. Biotechnol. 22, 345-362 (1972)

37. DUNN, I.J. and A. EINSELE: Oxygen transfer coefficients by the dynamic method. J. Appl. Chem. Biotechnol. 25, 707-720 (1975)

38. DUNN, I.J. and J.-R. MOR: Variable-volume continuous cultivation. Biotechnol. Bioeng. 17, 1805-1822 (1975)

39. ENFORS, S.O. and H. NILSSON: Application of an enzyme electrode for penicillin analysis in fermentation. Abstracts. 5th int. Fermentation Symp. Berlin (1976) p. 23

40. FEREN, C.J. and R.W. SQUIRES: The relationship between critical oxygen level and antibiotic synthesis of capreomycin and cephalosporin C. Biotechnol. Bioeng. 11, 583-592 (1969)

41. FIECHTER, A.: Die kontinuierliche Züchtung von Mikroorganismen als apparatives Problem. Biotechnol. Bioeng. 7, 101-128 (1965)

42. FIECHTER, A. and K. VON MEYENBURG: Automatic analysis of gas exchange in microbial systems. Biotechnol. Bioeng. 10, 535-549 (1968)

43. FIECHTER, A.: mündliche Mitteilung

44. FINN, R.K.: Agitation-aeration in the laboratory and in industry. J. Bact. Rev. 18, 254-274 (1954)

45. FLOSS, H.G. und U. MOTHES: Über den Einfluß von Tryptophan und analogen Verbindungen auf die Biosynthese von Clavinalkaloiden in saprophytischer Kultur. Arch. Microbiol. 48, 213-221 (1964)

46. GIONA, A.R., L. MARRELLI, L. TORO and R. DE SANTIS: Kinetic analysis of penicillin production by semi-continuous fermenters. Biotechnol. Bioeng. 18, 473-492 (1976)

47. GREENHALGH, S.H., W.J. McMANAMEY and K.E. PORTER: A comparision of oxygen mass transfer into sodium sulphite solution and a biological system. J. Appl. Chem. Biotechnol. 25, 143-159 (1975)

48. HANSFORD, G.S. and A.E. HUMPHREY: The effect of equipment scale and degree of mixing on continuous fermentation yield at low dilution rates. Biotechnol. Bioeng. 8, 85-96 (1966)

49. HATTORI, K., S. YOKOO and O. IMADA: Oxygen transfer in a highly viscous solution. J. Ferment. Technol. 50, 737-741 (1972)

50. HEBERLE, W.: Asposterol, ein Antibiotikum aus Aspergillus microcysticus.Untersuchungen zur Isolierung, Charakterisierung und Wirkungsweise. Dissertation Universität Tübingen (1974)

51. HEBERLE, W. und W. LOEFLER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 136. Mitteilung. Asposterol, ein Antibiotikum aus Aspergillus microcysticus. Arch. Microbiol. 100, 73-95 (1974)

52. HEINEKEN, F.G.: On the use of fast-response dissolved oxygen probes for oxygen transfer studies. Biotechnol. Bioeng. 12, 145-154 (1970)

53. HERBERT, D.: Continuous culture, monograph No. 12. London, Society of Chemical Industry (1961) p. 21

54. HOCH, G. and B. KOK: A mass spectrometer inlet system for sampling gases dissolved in liquid phases. Arch. Biochem. Biophys. 101, 160-170 (1963)

55. HOSPODKA, J.: Oxygen-absorption rate-controlled feeding of substrate into aerobic microbial cultures. Biotechnol. Bioeng. 8, 117-134 (1966)

56. HUANG, M.Y. and H.R. BUNGAY: Microprobe measurements of oxygen concentrations in mycelial pellets. Biotechnol. Bioeng. 15, 1193-1197 (1973)

57. HUMPHREY, A.E.: Present-day limitations in the control and understanding of a fermentation process. G-I-T-Fachz. Lab. 16, 350-355, 711-714 (1972)

58. JARAI, M., E. GYÖRY and J. TOMBOR: Oxygen transfer in Streptomyces fermentation broths. Biotechnol. Bioeng. 11, 605-622 (1969)

59. JOHNSON, M.J., J. BORKOWSKI and C. ENGBLOM: Steam sterilizable probes for dissolved oxygen measurement. Biotechnol. Bioeng. 6, 457-468 (1964)

60. KAPPNER, M., A. HASENBÖHLER und H. ZÄHNER: Optimierung der Desferri-Ferricrocinbildung bei Aspergillus viridi-nutans Ducka and Thrower. Arch.Microbiol.115, 323-331 (1977)

61. KELLER, H.-J.: Die elektronische Erfassung und Verarbeitung physikalisch-chemischer Meßgrößen am Beispiel des pH-Wertes und des Redoxpotentials. Vortrag am 2. Schweiz. Treffen für Chemie, ILMAC, Basel (1968)

62. KEMPE, L.L.: Sterilization of media for biochemical processes. Adv. Appl. Microbiol. 2, 313-319 (1960)

63. KREBS, W.M. and I.A. HADDAD: The oxygen electrode in fermentation systems. Dev. ind. Microbiol. 13, 113-127 (1972)

64. LENGYEL, Z.L. and L. NYIRI: Studies on automatically aerated biosynthetic processes. II. Occurence and elimination of CO_2 during penicillin biosynthesis. Biotechnol. Bioeng. 8, 337-352 (1966)

65. LINEK, V. and V. VACEK: Oxygen electrode response lag induced by liquid film resistance against oxygen transfer. Biotechnol. Bioeng. 18, 1537-1555 (1976)

66. LUNDSGAARD, J.S., L.C. PETERSEN and H. DEGN: Mass spectrometric determination of oxygen kinetics in biochemical systems, in: Measurement of oxygen, eds. H. Degn, I. Balslev and R. Brook (Elsevier scientific publishing company, Amsterdam, Oxford, New York, 1976) p. 168-183

67. MALEK, I. and Z. FENCL: Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms, eds. I. Malek and Z. Fencl (Academic Press, New York - London, 1966)

68. MANCY, K.H., D.A. OKUN and C.N. REILLEY: A galvanic cell oxygen analyzer. J. Electroanal. Chem. 4, 65-92 (1962)

69. MERTA, K. and I.J. DUNN: Oxygen electrode characteristics. Biotechnol. Bioeng. 18, 591-593 (1976)

70. MINDT, W., PH. RACINE and P. SCHLÄPFER: Sensoren für Lactat und Glucose. Ber. Bunsen-Gesellschaft Physik. Chem. 77, 804-808 (1973)

71. MIURA, Y.: Transfer of oxygen in scale-up in submerged aerobic fermentation, in: Advances in Biochemical Engineering, vol. 4, eds. T.K. Ghose, A. Fiechter and N. Blakebrough (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1974) p. 3-40

72. MOO-YOUNG, M.B.: Aspects of mass-transfer in fermentor design. Vortrag am Weiterbildungskurs in Bioengineering am Mikrobiol. Inst. der ETHZ, Zürich (1973)

73. MOR, J.-R. and R. GUARNACCIA: Assay of glucose using an electrochemical enzymatic sensor. Anal. Biochem. 79, 319-328 (1977)

74. NGIAN, K.F. and S.H. LIN: Diffusion coefficient of oxygen in microbial aggregates. Biotechnol. Bioeng. 18, 1624-1627 (1976)

75. NOBBS, McK.: Mass spectrometric determination of oxygen, in: Measurement of oxygen, eds. H. Degn, I. Balslev and R. Brook (Elsevier scientific publishing company, Amsterdam, Oxford, New York, 1976) p. 209-225

76. NYIRI, L. and Z.L. LENGYEL: Studies on automatically aerated biosynthetic processes. I. The effect of agitation and CO_2 on penicillin formation in automatically aerated liquid cultures. Biotechnol. Bioeng. 7, 343-354 (1965)

77. OHNO, H. and E. NAKANISHI: Optimal control of a semi-batch fermentation. Biotechnol. Bioeng. 18, 847-864 (1976)

78. ORION-MANUAL (1973)

79. PÂCA, J., P. ETTLER and V. GRÊGR: Hydrodynamics behaviour and oxygen transfer rate in a pilot plant fermenter. J. Appl. Chem. Biotechnol. 26, 309-317 (1976)

80. PAN, C.H., L. HEPLER and R.P. ELANDER: Control of pH and carbohydrate addition in the penicillin fermentation. Dev. ind. Microbiol. 13, 103-112 (1972)

81. PETERSON, R.E. and A. CIEGLER: Factors influencing L-asparaginase production by Erwinia aroideae. Appl. Microbiol. 23, 671-673 (1972)

82. PHILLIPS, D.H.: Oxygen transfer into mycelial pellets. Biotechnol. Bioeng. 8, 456-460 (1966)

83. PIRT, S.J.: A theory of the mode of growth of fungi in the form of pellets in submerged culture. Proceedings of the Royal Society, 166, 369-373 (1966)

84. PIRT, S.J.: The theory of fed batch culture with reference to the penicillin fermentation. J. Appl. Chem. Biotechnol. 24, 415-424 (1974)

85. PIRT, S.J. and B. MANCINI: Inhibition of penicillin production by carbon dioxide. J. Appl. Chem. Biotechnol. 25, 781-783 (1975)

86. PIRT, S.J., R.C. RIGHELATO: Effect of growth rate on the synthesis of penicillin by Penicillium chrysogenum in batch and chemostat cultures. Appl. Microbiol. 15, 1284-1290 (1967)

87. POWER, G. and H. STEGALL: Solubility of gases in human red blood cell ghosts. J. Appl. Physiol. 29, 145-149 (1970)

88. PRESSLER, G.: Regelungstechnik. B-I-Hochschultaschenbuch, Band 63. (Bibliographisches Institut, Mannheim, Wien, Zürich, 1967)

89. REUSS, M.: Zukünftige Möglichkeiten computergesteuerter Fermentationstechnik. Chemie-Ing.-Techn. 16, 676-680 (1974)

90. REUSS, M., H. PIEHL and F. WAGNER: Application of mass spectrometry to the measurement of dissolved gases and volatile substances in fermentation. J. Appl. Microbiol. 1, 323-325 (1975)

91. REUSS, M., H. PIEHL and F. WAGNER: Application of mass spectrometer to the measurement of dissolved gases and volatile substances in fermentation. 5th int. Fermentation Symp., Berlin (1976) p. 25

92. REUSSER, F.: Continuous fermentation of novobiocin. Appl. Microbiol. 9, 366-370 (1961)

93. RIGHELATO, R.C.: Growth kinetics of mycelial fungi, in: The filamentous fungi, eds. J.E. Smith and D.R. Berry (Edward Arnold Limited, London, 1975) p. 79-103

94. RIGHELATO, R.C. and S.J. PIRT: Improved control of organism concentration in continuous cultures of filamentous micro-organisms. J. Appl. Bact. 30, 246-250 (1967)

95. ROENNEFAHRT, K.W.: Die elektrochemische pH-Messung. G-I-T-Fachz. Lab. 2, 73-84 (1966)

96. ROWLEY, B.I. and S.J. PIRT: Melanin production by Aspergillus nidulans in batch and chemostat cultures. J. gen. Microbiol. 72, 553-563 (1972)

97. SATOH, I., I. KARUBE and S. SUZUKI: Enzyme electrode for sucrose. Biotechnol. Bioeng. 18, 269-272 (1976)

98. SIKYTA, B. and J. MASTNER: Automatic equipment for media sterilization. Biotechnol. Bioeng. 9, 575-583 (1967)

99. SINGH, R.M.M.: Role of carbon and nitrogen sources in bacterial growth and sporulation. Appl. Microbiol. 22, 131-132 (1971)

100. SLEVOGT, K., E. SEELOS und W. SCHRAIDT: Studie über die kontinuierliche Messung mit ionenselektiven Elektroden. Wissenschaftliche-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim (1974)

101. SOLOMONS, G.L.: Fermentation equipment. Adv. Appl. Microbiol. 14, 231-247 (1971)

102. SQUIRES, R.W.: Regulation of the penicillin fermentation by means of a submerged oxygen-sensitive electrode. Dev. ind. Microbiol. 13, 128-135 (1972)

103. STEEL, R. and W.D. MAXON: Dissolved oxygen measurements in pilot- and production-scale novobiocin fermentations. Biotechnol. Bioeng. 8, 97-108 (1966)

104. STUART, T.S., E.W. HEROLD, Jr., and H. GAFFRON: A simple combination mass spectrometer inlet and oxygen electrode chamber for sampling gases dissolved in liquids. Anal. Biochem. 46, 91-100 (1972)

105. TAGUCHI, H., K. SUGA and T. YOSHIDA: A new approach for the oxygen transfer rate in a fermenter. Proceedings of the 4th int. Fermentation Symp. Kyoto (1972) p. 83-89

106. TIMSON, W.J. and C.G. DUNN: Mechanism of gas absorption from bubbles under shear. Ind. Eng. Chem. 52, 799 (1960)

107. TOPLIN,I.:Continuous chemical sterilization of microbiological media with ß-propiolactone. Biotechnol. Bioeng. 4, 331-340 (1962)

108. TSAO, G.T.: Simultaneous gas-liquid interfacial oxygen absorption and biochemical oxidation. Biotechnol. Bioeng. 10, 765-785 (1968)

109. TUFFILE, C.M. and F. PINHO: Determination of oxygen transfer coefficients in viscous Streptomycete fermentations. Biotechnol. Bioeng. 12, 849-871 (1970)

110. UMBREIT, W.W., R.H. BURRIS and J.F. STAUFFER: Manometric techniques and tissue metabolism, eds. W.W. Umbreit, R.H. Burris and J.F. Stauffer (Burgess Publishing Co. Minneapolis 15, Minn., 1951) p. 5

111. VIRGILIO, A., E. MARCELLI and A. AGRIMINO: Aeration-agitation studies on the rifamycin fermentation. Biotechnol. Bioeng. 6, 271-283 (1964)

112. VOGEL, H.R.: Continuous recording of pO_2 in respiratory air by a rapid platinum electrode. Progr. Respir. Res. 3, 42-46 (1969)

113. VOTRUBA, J. and M. SOBOTKA: Measurement of fermentor aeration capacity by fast-response oxygen electrode. Biotechnol. Bioeng. 18, 1814-1819 (1976)

114. WANG, D. I.-C. and A.E. HUMPHREY: Developments in agitation and aeration of fermentation systems. Prog. Ind. Microbiol. 8, 1-34 (1968)

115. WOLDRING, S., G. OWENS and D.C. WOOLFORD: Blood gases: Continuous in vivo recording of partial pressures by mass spectrography. Science, 153, 885-887 (1966)

116. YANO, T., T. KODAMA and K. YAMADA: Fundamental studies on the aerobic fermentation. Part 8. Oxygen transfer within a mold pellet. Agric. Biol. Chem. 25, 580-584 (1961)

117. YOSHIDA, F., T. YAMANE, K. NAKAMOTO: Fed-batch hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. Biotechnol. Bioeng. 15, 257-270 (1973)

118. ZÄHNER, H.: Einige Aspekte der Antibiotica-Forschung. Angew. Chem. 89, 696-703 (1977)

119. ZETELAKI, K. and K. VAS: The role of aeration and agitation in the production of glucose-oxidase in submerged culture. Biotechnol. Bioeng. 10, 45-59 (1968)

Lebenslauf

Am 13. März 1946 wurde ich in Basel geboren. In Therwil bei Basel besuchte ich von 1953 bis 1958 die Primar- und von 1958 bis 1962 die Realschule. Die Mittelschule absolvierte ich im Kollegium Maria-Hilf in Schwyz, das ich am 25. Februar 1966 ohne Abschluß unfreiwillig verlassen mußte. Zur Vorbereitung der Aufnahmeprüfung an die Eidgenössische Technische Hochschule in Zürich besuchte ich ab 14. März 1966 das Institut Minerva in Zürich; im September 1966 bestand ich die Aufnahmeprüfung und studierte ab folgendem Wintersemester an der Abteilung für Landwirtschaft der ETH in Zürich. Im September 1967 legte ich das 1. und im April 1969 das 2. Vordiplom ab. Danach wählte ich das Studium in agrotechnologischer Richtung, das ich im September 1971 mit der Diplomprüfung abschloß.

Im Wintersemester 1971 begann ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I der Universität Tübingen mit der Durchführung dieser Arbeit; neben dieser Tätigkeit habe ich mich mit der Betreuung und dem Ausbau der Fermentationsanlagen befaßt.

Meine akademischen Lehrer waren:

in Zürich: O. Angehrn, P. Bovey, H. Bühlmann,
E. Dal Vesco, F. Emch, L. Ettlinger,
A. Fiechter, H. Flück, A. Frey-Wyssling,
H.-P. Friedrich, R. Fritzsche, A. Hauser,
F. Held, H. Hess, H. Heusser, R. Hütter,
O. Jaag, H. Kern, R. Koblet, J. Landis,
E. Landolt, H.-L. Le Roy, H. Lörtscher,
C. Martius, P. Matile, J. Neukom,
H. Pfenninger, A. Prabucki, F. Ruch,
A. Schürch, E. Sheldon, J. Solms, H. Urlich,
J. Vallat, E. Zollikofer.

in Tübingen: H. Zähner.

Druck: aku-Fotodruck, Eckbertstr. 19, 8600 Bamberg